41B212+

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

224. BAND, 4. HEFT
MIT 25 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 26. JANUAR 1955

BOSTON
FEB 28 1955
MEDICAL LIBRARY

CATALOGUED
DEC 22 1955
L. R. V.

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

Arch. exper. Path. u. Pharmakol.

Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.
Begründet 1873 von *B. Naunyn, O. Schmiedeberg, E. Klebs.* Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von *L. Krehl, W. Straub, W. Heubner* u. a., ab Band 208/2 unter Mitwirkung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft.
Band 2—158 (1931) Leipzig, F. C. W. Vogel, Band 159—198 (1941) Berlin, F. C. W. Vogel.
Ab Band 199 Berlin, Springer.

Die Zeitschrift erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials in Heften, die zu Bänden zusammengestellt werden. Der Preis des Bandes beträgt DM 82.—.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte sind zu senden an:
Prof. Dr. W. Heubner, Heidelberg, Ladenburger Str. 69,
Prof. Dr. L. Lendle, Göttingen, Geiststr. 9, Pharmakologisches Institut der Universität,
Prof. Dr. L. Heilmeyer, Freiburg i. Br., Hugstetterstr. 55, Medizinische Universitätsklinik,
oder an den

Springer-Verlag

Heidelberg Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

Berlin W 35 Reichpietschufer 20, Fernsprecher 24 92 51

224. Band **Inhaltsverzeichnis.** 4. Heft

Seite

Krüskemper, H. L., und **F. Hartmann,** Der Einfluß von Allylformiat auf den Sauerstoffverbrauch, die Triacetinspaltung, die Cholinoxydation und die Phosphataseaktivität der Leber und auf die Serumeiweißfraktionen von Ratten. Mit 2 Textabbildungen 275

Schwalb, H., A. Bauernfeind und **H. Hensel,** Die Wirkung von Natriumfluorid auf die renale Ausscheidung von p-Aminohippursäure, Kreatinin, Chlorid und Harnstoff beim Hund 285

Giertz, H., und **I. Iurna,** Zur Aktivierung der sympathischen Überträgerstoffe durch Methyldonatoren 295

Repke, K., Über die Schutzwirkung von Glutathion, Cystein und Dimercaptopropanol bei der Hämolyse durch ultraviolette Strahlen. Mit 6 Textabbildungen 300

Bänder, A., und **M. Kiese,** Die Wirkung des sauerstoffübertragenden Ferments in Mitochondrien aus Rattenlebern bei niedrigen Sauerstoffdrucken. Mit 4 Textabbildungen 312

Hartmann, F., und **H.-J. Gerth,** Der Wirkungsmechanismus des meso-Inosit als lipotrope Substanz bei der Bestschen Mangelkostratte 322

Rohr, H., Zur Frage einer Campherwirkung auf Synapsen im motorischen und vegetativen Nervensystem. Mit 3 Textabbildungen 327

Mechelke, K., und **E. Nusser,** Über die Kreislaufwirkung des Buscopan beim gesunden Menschen. Mit 1 Textabbildung 338

Markwardt, F., und **K. Repke,** Die Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17β durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem. Mit 1 Textabbildung 341

Kramer, M., Herzwirkung und enterale Resorption des Thevetins. Mit 1 Textabbildung 348

Lindner, E., Der Einfluß von Derivaten der Diphenylmethanreihe auf acetylcholinvermittelnde Wirkungen. Mit 2 Textabbildungen 357

Dörner, J., und **H.-J. Kuschke,** Die Beeinflussung der neurogenen Adrenalin- und Arterenoldilatation der Skeletmuskelgefäße durch Novocain, Atropin und Physostigmin, zugleich ein Beitrag zur Frage der Existenz vasodilatatorischer Nerven 368

Kuschke, H.-J., und **M. Kuschke,** Polarisationsoptische Untersuchung zur Frage morphologischer Veränderungen an der Markscheide peripherer Nerven durch Novocain. Mit 1 Textabbildung 378

Friebel, H., C. Reichle und **A. v. Graevenitz,** Zur Hemmung des Hustenreflexes durch zentral angreifende Arzneimittel. Mit 4 Textabbildungen . . 384

Berichtigung zur Arbeit Zorn und Mankel, Band 223, Seite 362—368 (1954) 400

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Warenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 275—284 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen).

Der Einfluß von Allylformiat auf den Sauerstoffverbrauch, die Triacetinspaltung, die Cholinoxydation und die Phosphataseaktivität der Leber und auf die Serumeiweißfraktionen von Ratten.

Von
Hans-Ludwig Krüskemper und Fritz Hartmann.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. Oktober 1954.)

Die Stoffwechselveränderungen der kranken Leber beanspruchen großes Interesse, doch erstreckt sich unsere Kenntnis meist nur auf die Endresultate der Leberleistung und wir wissen kaum etwas über das Verhalten der Zellfermente in der geschädigten Leber. Die Abweichungen bei einer Anzahl von Serumfermenten bei Leberkrankheiten sind zwar leichter zu erfassen, geben uns aber keinen schlüssigen Hinweis auf die Leberzellvorgänge selbst.

So steigen bei Leberparenchymschäden die chininresistente Lipase (Rona, Petow u. Schreiber), die alkalische Phosphatase (Koller, Rosenmund u. Zuppinger) und die Diastase (Wohlgemuth; Eppinger) an. Cholesterinesterase (Klein), Cholinesterase (Schaller) und Novocainesterase (Stucki) sind vermindert. Histochemische Untersuchungen an Tieren mit experimenteller Schädigung der Leber (Wachstein; Wachstein u. Zak; Eger) haben schwere Verteilungsstörungen der Zellphosphatasen ergeben. Auch am Menschen ist durch die Leberpunktion frisches Material für histochemische Untersuchungen zugänglich geworden. Solche Untersuchungen ergeben aber mehr qualitative als quantitative Fermentstörungen, die von Eger als Dysenzymie bezeichnet worden sind (Wachstein; Wachstein u. Zak; Sherlock and Walsche; Deane).

Die „Fermentanarchie", die von seiten der pathologischen Physiologie als das Wesen schwerer Leberschädigungen wie z. B. der akuten Leberdystrophie vermutet wird, ist vereinzelt biochemisch untersucht worden. Sie ist als „Anarchie" ein Endzustand und entwickelt sich über eine Stufenleiter der allmählichen Auflösung der natürlichen Ordnung der Zellfermente.

Diese Ordnung ist eng mit dem strukturellen Aufbau der Zelle verknüpft, denn die Fermente sind an verschiedene Zellstrukturen wie Kern, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytoplasma voneinander getrennt gebunden (Lang). An kranken menschlichen Lebern liegen bisher keine biochemischen Untersuchungen des Fermentstoffwechsels vor; denn die Leber zeigt sehr schnell nach dem Tode strukturelle Veränderungen, die einwandfreie Rückschlüsse auf die während des Lebens vorhanden gewesenen Abweichungen verhindern.

Biochemische Untersuchungen über Fermentstörungen in geschädigten Lebern sind deswegen auf Tierexperimente beschränkt geblieben. Bei der hungernden Ratte sinkt das Glutathion und die Aktivität der Katalase, der alkalischen Phosphatase, der Xanthinoxydase und des Kathepsins in der Leber parallel zum Verlust des Leberproteins ab (Miller). Nach partieller Hepatektomie sinkt bei der Ratte die Adenosintriphosphatase zunächst für 3—4 Tage stark ab, um dann parallel der Regeneration wieder anzusteigen (Allard u. Cantero). Unter Vitamin B_2-Mangel ist die Cholinoxydation in der Rattenleber vermindert (Viollier); bei der Alarmreaktion nimmt die alkalische Phosphatase ebenso zu (Herlant u. Timirus) wie unter der Wirkung von Nebennierenrindenhormonen (Kochakian u. Bartlett). In der mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Rattenleber fällt die Esteraseaktivität mit der Fetteinlagerung ab (Koch-Weser). Das entspricht den histochemischen Ergebnissen von Mark, der in verfettetem und neoplastischem Lebergewebe keine Esterasereaktion mehr nachweisen konnte. Colchicin reduziert in der Leber der wachsenden Maus die Glukuronidaseaktivität (Kerr, Campbell and Levvy).

Die akute und chronische Allylformiatvergiftung wurden in ihrer Wirkung auf Leberatmung und -glykolyse von Benda, Locker u. Rissel untersucht. Sie fanden bei der akuten Vergiftung einen Anstieg von Sauerstoffverbrauch und CO_2-Bildung wenn kleine Dosen verwandt wurden. Größere Dosen bewirkten eine zweite starke Hemmungsphase. Bei der chronischen Vergiftung ist der Verlauf ebenfalls 2phasig. Schließlich geht die Atmung auf Normalwerte zurück.

Die hier vorgelegten Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, an mehreren voneinander unabhängigen Fermentprozessen die Wirkung einer typischen und dosierbaren Leberschädigung, wie der Allylformiatvergiftung zu studieren. Vor allem sollte durch gleichzeitige histologische Kontrolle und Untersuchung der Serumeiweißfraktionen ein Anhaltspunkt dafür gewonnen werden, in welchem Verhältnis die fermentativen Störungen zum Ausmaß des Leberschadens stehen. Ein besonders wichtiges Problem war, ob die fermentativen Prozesse gleichsinnig gestört sind oder ob eine völlige Regellosigkeit vorherrscht, wie sie für die schweren Leberdystrophien vermutet wird.

Methodik.

Als *Versuchstiere* dienten männliche Albinoratten (in Gruppen von 5 bis 7 Tieren) mit einem Gewicht von 100—130 g, die bei einer Standarddiät gehalten wurden. Wasser ad libitum.

Das *Allylformiat* (AF) wurde täglich einmal subcutan in einer Dosis von 50 mg/kg Ratte gegeben, und zwar in 0,5 ml täglich frisch bereiteter Ringer-Lösung/100 g Körpergewicht. Versuchsdauer 1—4 Wochen.

Die Tiere wurden 24 Std nach der letzten Fütterung durch Herzschnitt getötet. Die Nebennieren wurden frisch gewogen (± 0,2 mg).

Die *Gewebsatmung* der Leber wurde manometrisch gemessen (Versuchsmedium: Ringer-Lösung mit 0,2% Glucose und 0,15 m Phosphatpuffer p_H 7,2). Trockengewicht etwa 20 mg/Ansatz. Versuchszeit 60 min. Temperatur 37,5°.

Die Aktivität der *Cholinoxydase* wurde im Lebervollhomogenat nach Krüskemper u. Dirscherl ermittelt (Versuchsmedium: Ringer-Phosphatlösung, Verhältnis 4:1, Phosphatpuffer 0,15 m, p_H 7,6; Cholinendkonzentration 10^{-2} m). Aktivitätsangabe in Kubikmillimeter Sauerstoffverbrauch/mg Trockengewebe/30 min, nach Abzug des Wertes für die Grundatmung.

Die Aktivität der *alkalischen Leberphosphatase* wurde ebenfalls im Homogenat bestimmt. Methodik siehe KIRBERGER u. MARTIN. Aktivitätsangabe in KING-ARMSTRONG-Einheiten/10 mg Trockengewebe.

Die *Triacetinspaltung* durch Leberhomogenat wurde manometrisch gemessen. Versuchsmedium: RINGER-Bicarbonat-Puffer, p_H 7,4. Versuchszeit 15 min. Temperatur 37,5°. Trockengewicht 2—4 mg/Ansatz. Triacetinendkonzentration: $5 \cdot 10^{-3}$ m. Angabe der Spaltungsgröße in Kubikmillimeter CO_2/mg Trockengewebe/15 min.

Die Bestimmung der *Serumeiweißfraktionen* geschah nach Trennung in der Apparatur nach ANTWEILER mit der bei HARTMANN u. SCHUMACHER beschriebenen Methode. Das Gesamteiweiß im Serum wurde refraktometrisch ermittelt.

Die *statistische Auswertung* der Ergebnisse wurde nach der Methode von PÄTAU durchgeführt. Angegeben wird jeweils die Wahrscheinlichkeit p für die Homogenität der verglichenen Werte ($p = > 0{,}05$: nicht signifikant; $p = 0{,}05$—$0{,}01$*: schwach signifikant; $p = 0{,}01$—$0{,}001$**: signifikant; $p = < 0{,}001$***: hochsignifikant).

Ergebnisse.

Ausgeprägte *toxische Allgemeinwirkungen* wurden, abgesehen von dem kurz nach der Injektion von AF eintretenden und rasch abklingenden narkoseähnlichen Zustand der Versuchstiere, unter den gewählten Versuchsbedingungen (50 mg/kg/Tag; bis zu 4 Wochen) vermißt. Es kam lediglich zeitweilig zum Auftreten diarrhoischer Erscheinungen. Die Sterblichkeit war bei Versuchs- und Kontrolltieren von gleichem Ausmaß. Das Körpergewicht nahm zwar bei den Versuchsti eren weniger rasch zu als bei den normalen unbehandeltenKontrollen, sichere Differenzen bestanden hier jedoch nicht.

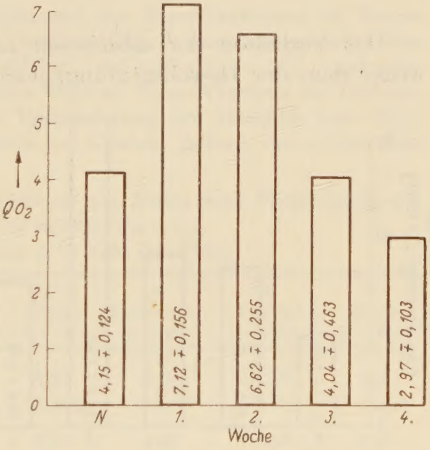


Abb. 1. Das Verhalten der Gewebsatmung der Leber bei Vergiftung mit Allylformiat (50 mg/kg/Tag). Ordinate: Sauerstoffverbrauch (Q_{O_2}); Abszisse: Einzelne Gruppen, N = unbehandelte Kontrollen. Behandlungszeit bis zu 4 Wochen. Statistische Auswertung siehe Tab. 4.

Das Verhalten der *Leberatmung* im Verlaufe längerer AF-Applikation ist aus Abb. 1 ersichtlich: Nach der 1. Woche lag die Atmungsgröße etwa 70% über dem Ausgangswert und blieb auch nach einer weiteren Behandlungswoche weiterhin gesteigert (um etwa 60%). Im Verlaufe der 3. Woche sank der Gewebsstoffwechsel wieder ab, zunächst, am Ende der Woche, auf „Normalwerte", dann noch weiter, um 4 Wochen nach Behandlungsbeginn einen Wert zu erreichen, der etwa 28% unter dem Ausgangswert lag (statistische Auswertung siehe Tab. 4).

Die Aktivität der *Cholinoxydase* (vgl. Tab. 1 und 4) zeigte ein dem der Gewebsatmung entgegengesetztes Verhalten: nach einem Abfall der Aktivität nach einer AF-Verabfolgung von einer bzw. zwei Wochen um etwa 20 bzw. 30% stieg die Cholinoxydation im Laufe weiterer Behandlung wieder auf den Ausgangswert an.

Tabelle 1. *Das Verhalten der Triacetinspaltung und der Cholinoxydation durch Lebergewebe nach Allylformiatverabfolgung (AF, 50 mg/kg/Tag, s. c.).*
Angaben für die Triacetinspaltung: mm^3 CO_2/15 min/mg Trockengewebe; für die Cholinoxydation: mm^3 O_2-Verbrauch/30 min/mg Trockengewebe. M = Mittelwert. n = Zahl der Messungen.

	Normale Kontrollen	AF 1 Woche	AF 2 Wochen	AF 3 Wochen	AF 4 Wochen
Triacetinspaltung (M)	16,69	33,58	22,78	22,92	20,50
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 1,18	$\pm$ 2,07	$\pm$ 1,24	$\pm$ 2,12	$\pm$ 0,91
n	10	8	9	9	10
Cholinoxydation (M)	3,30	2,61	2,29	3,27	3,19
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,221	$\pm$ 0,250	$\pm$ 0,191	$\pm$ 0,444	$\pm$ 0,259
n	6	7	6	6	6

Das Verhalten der *alkalischen Leberphosphatase* (vgl. Abb. 2) ging weder dem der Gewebsatmung, noch dem der Cholinoxydase parallel. Nach einwöchiger AF-Behandlung war zwar die Aktivität um etwa 70% gegenüber der Norm gesteigert, die Differenz auf Grund der großen Streuung jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Tab. 4); erst nach einer weiteren Woche konnte der entsprechende Aktivitätsanstieg des Ferments (um 80%) statistisch gesichert werden. Am Ende der 3. Behandlungswoche hatte die Fermentaktivität ihr Maximum erreicht und belief sich auf etwa das 3½fache des Ausgangswertes. Anschließend sank sie rasch ab und lag nach der 4. Woche über 50% unter dem 3 Wochen-, aber immer noch deutlich über dem Ausgangswert.

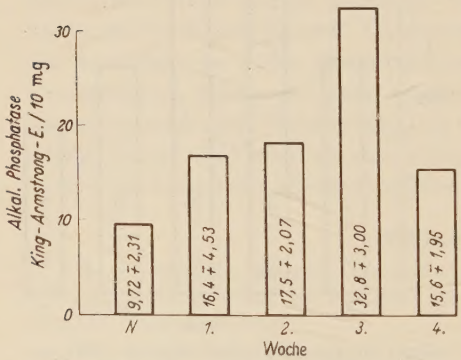


Abb. 2. Das Verhalten der alkalischen Leberphosphatase bei Vergiftung mit Allylformiat (50 mg/kg/Tag). Ordinate: Fermentaktivität in KAE/10 mg Trockengewebe. Abszisse: Einzelne Gruppen, *N* unbehandelte Kontrollen. Behandlungszeit bis zu 4 Wochen. Statistische Auswertung siehe Tab. 4.

Die *Triacetinspaltung* (vgl. Tab. 1 und 4) verhielt sich im Verlaufe der AF-Behandlung so, daß es zunächst (nach 1 Woche) zu einem Anstieg der Esterspaltungsgröße um etwa 100% kam. Später sank der

Spaltungswert wieder ab, und zwar nach 2 Wochen um 33%, nach 3 Wochen um 32% und nach 4 Wochen um 39% gegenüber dem Wert nach 1wöchiger AF-Applikation. Verglichen mit dem Normalwert war die Triacetinspaltung während der gesamten Versuchsdauer konstant erhöht.

Das *Nebennierengewicht* (vgl. Tab. 2) nahm bereits nach 7tägiger AF-Verabfolgung deutlich zu (um 23%) und blieb auch im weiteren Verlauf der Behandlung um 42% (nach 2 Wochen), 40% (3 Wochen) und 32% (4 Wochen) über dem Ausgangswert.

Tabelle 2. *Veränderungen des Nebennierengewichts von Ratten nach Allylformiat (AF; 50 mg/kg/Tag; s. c.).*
Angaben in mg/100 g Ratte; M = Mittelwert; n = Zahl der Tiere.

	Normale Kontrollen ($n = 15$)	AF 1 Woche ($n = 5$)	AF 2 Wochen ($n = 5$)	AF 3 Wochen ($n = 5$)	AF 4 Wochen ($n = 5$)
Nebennierengewicht (M)	19,4	23,9	27,5	27,1	25,7
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,746	$\pm$ 1,50	$\pm$ 3,21	$\pm$ 3,48	$\pm$ 1,74

Die Veränderungen des *Gesamteiweißes* und der *Eiweißfraktionen* im Serum unter längerdauernder AF-Behandlung sind in Tab. 3 zusammengestellt. Das Gesamteiweiß fiel nach 3 Wochen von 6,93 g% auf 5,97 g% (—14%) und stieg dann wieder auf einen angenähert normalen Wert an. Diese Abnahme des Gesamteiweißes war in erster Linie durch eine Verminderung der Albumine (um 25%) und, wenn auch quantitativ weniger stark ins Gewicht fallend, der γ-Globuline

Tabelle 3. *Das Verhalten der Serumeiweißkörper von Ratten nach Verabfolgung von Allylformiat (AF) (50 mg/kg/Tag, s. c.).*
Angaben in g%. M = Mittelwert. n = Zahl der Tiere.

	Normale Kontrollen ($n = 5$)	AF 1 Woche ($n = 5$)	AF 2 Wochen ($n = 5$)	AF 3 Wochen ($n = 5$)	AF 4 Wochen ($n = 5$)
Gesamt-Eiweiß (M)	6,93	6,42	6,55	5,97	6,66
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,193	$\pm$ 0,169	$\pm$ 0,149	$\pm$ 0,504	$\pm$ 0,289
Albumin (M)	4,45	3,69	4,06	3,33	4,07
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,289	$\pm$ 0,128	$\pm$ 0,148	$\pm$ 0,376	$\pm$ 0,354
α-Globulin (M)	0,68	0,92	0,73	1,22	1,09
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,145	$\pm$ 0,065	$\pm$ 0,110	$\pm$ 0,178	$\pm$ 0,142
β-Globulin (M)	0,95	1,02	1,06	0,97	1,02
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,124	$\pm$ 0,020	$\pm$ 0,092	$\pm$ 0,056	$\pm$ 0,096
γ-Globulin (M)	0,86	0,80	0,70	0,54	0,47
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,131	$\pm$ 0,157	$\pm$ 0,121	$\pm$ 0,093	$\pm$ 0,033
Gesamt-Globulin (M)	2,48	2,54	2,49	2,62	2,60
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,197	$\pm$ 0,148	$\pm$ 0,138	$\pm$ 0,280	$\pm$ 0,072
Alb.-Glob.-Quotient (M)	1,80	1,45	1,65	1,56	1,59
$\pm \sigma_M$	$\pm$ 0,142	$\pm$ 0,118	$\pm$ 0,133	$\pm$ 0,174	$\pm$ 0,172

(um 37%) bedingt. Während sich der Albumingehalt im Verlauf der 4. Versuchswoche praktisch normalisierte, sank der γ-Globulinwert weiter ab und betrug am Ende der 4. Woche nur noch 55% des Ausgangswertes. Der Gesamtglobulingehalt des Serums veränderte sich nur unwesentlich im Sinne geringgradiger Steigerung. Dieser Effekt kam dadurch zustande, daß gleichzeitig mit der γ-Globulinabnahme eine deutliche Zunahme der α-Globuline eintrat, die quantitativ die Abnahme der γ-Fraktion, besonders nach 3wöchiger AF-Gabe, übertraf, insofern als der α-Zunahme von 0,54 g% eine γ-Abnahme um 0,32 g% entgegenstand. Die β-Globulinfraktion wies während der AF-Behandlung keine quantitativen Veränderungen auf. Auch der Albumin-Globulin-Quotient blieb, abgesehen von einer angedeuteten Senkung im Zusammenhange mit der Albuminabnahme nach 3 Wochen, praktisch konstant.

Tabelle 4. *Statistische Auswertung der in Text, Tabellen und Abbildungen zitierten Mittelwerte der einzelnen Gruppen (0 = unbehandelte Kontrolltiere, 1 = Allylformiat (AF) 1 Woche, entsprechend 2—4.*

Leberatmung		Alkal. Phosphatase		Triazetinspaltung		Cholinoxydation	
Verglichene Gruppen	p	Verglichene Gruppen	p	Verglichene Gruppen	p	Verglichene Gruppen	p
0/1	$< 0{,}001$***	0/1	$> 0{,}1$	0/1	$< 0{,}001$***	0/1	0,07
0/2	$< 0{,}001$***	0/2	0,04*	0/2	0,003**	0/2	0,007**
0/3	$> 0{,}1$	0/3	$< 0{,}001$***	0/3	0,02*	0/3	$> 0{,}1$
0/4	$< 0{,}001$***	0/4	0,06	0/4	0,02*	0/4	$> 0{,}1$
1/2	$> 0{,}1$	1/2	$> 0{,}1$	1/2	$< 0{,}001$***	1/2	$> 0{,}1$
1/3	$< 0{,}001$***	1/3	0,01**	1/3	0,003**	1/3	$> 0{,}1$
1/4	$< 0{,}001$***	1/4	$> 0{,}1$	1/4	$< 0{,}001$***	1/4	$> 0{,}1$
2/3	$< 0{,}001$***	2/3	$< 0{,}001$***	2/3	$> 0{,}1$	2/3	0,07
2/4	$< 0{,}001$***	2/4	$> 0{,}1$	2/4	$> 0{,}1$	2/4	0,018*
3/4	0,05*	3/4	$< 0{,}001$***	3/4	$> 0{,}1$	3/4	$> 0{,}1$

Histologische Befunde.*

1. Woche. Um die periportalen Felder angedeuteter Zelluntergang mit leichter Vermehrung und Reaktion des Reticulum. Spärliche histologische Infiltration der Glissonschen Dreiecke. Gelegentlich in den interlobulären Bezirken Reticulumknötchen mit Resten von untergegangenen Leberzellen. Zelluntergang in der Peripherie der Knötchen. Kein Fettgehalt nachweisbar.

2. Woche. Veränderungen um die periportalen Felder etwas stärker ausgeprägt. Verdichtung und Zellkollaps der Parenchymzellen. Stärkere Reaktion des reticulo-endothelialen Apparates in diesem Bereich. Die Parenchymzellen im gesamten Leberläppchen sind gut erhalten. Gelegentlich einzelne dunkle kollabierte Zellen. Kein Fettgehalt. Deutlich ausgeprägte interlobuläre Knötchen, die nun dichter und umgrenzter erscheinen.

3. Woche. Deutliche Verbreiterung der Glissonschen Dreiecke durch Untergang der angrenzenden Parenchymzellen und Reaktion des Reticulum. Im wesentlichen eine Verstärkung der bisher beschriebenen Prozesse. Einzelne periportale Felder zeigen auffällig ödematöse, aufgelockerte und aufgehellte Parenchymzellen.

* Für die histologische Auswertung der Leberparenchymveränderungen sagen wir Herrn Priv.-Doz. Dr. Eger (Pathol. Institut der Universität Göttingen) unseren herzlichen Dank.

Vereinzelt deutliche Vacuolen und Kariolyse. Gelegentlich dunkle, stärker eosingefärbte Parenchymschollen. Die interlobulären Knötchen sind jetzt nicht mehr nachweisbar.

4. Woche. Wesentlichere Verbreiterung der Glissonschen Dreiecke, die zum Teil durch Untergangsstraßen mit Reticulumwucherungen sich miteinander verbinden, so daß bereits das Bild einer Leber-Cirrhose entsteht. In diesen Feldern beträchtliche Lympho- und Leukocyteninfiltrationen. Die angrenzenden Leberzellen meist mit ödematös aufgequollenem Protoplasma, Vacuolenbildung und Übergang in vacuolige Degeneration der Gesamtzellen. In die bindegewebige Wucherung eingeschlossen kollabierte untergehende Parenchymzellen. Leberläppchen noch deutlich vorhanden. Die Zellen zeigen ein ziemlich dichtes Protoplasma. Regelrechte Anordnung der Leberbalken. Ein Umbau im Sinne einer echten Cirrhose noch nicht vorhanden. Im Bereich der Narben und der Bindegewebsfelder feintropfige Fettablagerung in den Zellen, wohl als Ausdruck der Degeneration. Neben einer vacuoligen somit eine fettige Degeneration.

Besprechung der Ergebnisse.

Bei der durch parenterale Gaben von Allylformiat erzeugten Vergiftung muß man bedenken, daß sie nicht zu einer isolierten Leberschädigung führt. Vielmehr wird an vielen Organen das Bild einer „serösen Entzündung" beobachtet, die von Eppinger als Ausdruck einer Permeabilitätsstörung der Blut-Gewebsschranke aufgefaßt worden ist. Die Gewichtszunahme der Nebennieren in den vorliegenden Versuchen kann Zeichen einer solchen serösen Durchtränkung des Organs sein. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, daß die Nebenniere im Rahmen des Adaptationssyndroms — eines Anpassungs- und Abwehrvorganges an den Vergiftungs-„Stress" — durch Lipoidbildung an Gewicht zunimmt. Die initiale Phase mit Gewichtsverlust wurde ebensowenig beobachtet, wie der bei chronischer Überlastung durch einen Dauerschaden eintretende anatomische und funktionelle Zusammenbruch des Organs (Selye).

Die histologischen Befunde der Rattenlebern zeigen zunächst das von Eppinger beschriebene Bild einer serösen Entzündung mit beginnendem Zelluntergang. In fortgeschrittenen Stadien der Allylformiatwirkung treten neben vermehrtem periportalen Zelluntergang auch Zeichen der Bindegewebswucherung hervor: Cirrhose folgt der Degeneration.

Der kontinuierlich fortschreitenden degenerativ-cirrhotischen Veränderung des Lebergewebes gehen die Serumeiweißveränderungen nicht parallel.

In der menschlichen Leberpathologie gilt unter ähnlichen Umständen ein Absinken der Albumine und eine Zunahme der γ-Globuline als typisch (Wuhrmann u. Wunderly). Jedoch beobachtet man in Anfangsstadien der Hepatitis, bei der Cholangitis und der akuten Leberdystrophie auch einen Anstieg der α- und β-Globuline. Je stärker die akut entzündliche Komponente ist, um so stärker treten die α-Globuline in den Vordergrund. Bei der cholangitischen Lebercirrhose können die β-Globuline das Bild beherrschen (Hartmann u. Steinbach).

Bei den vorliegenden Versuchen ist das Absinken des Gesamteiweißes als Ausdruck des Eiweißverlustes in das Gewebe zu werten. Besonders daran beteiligt sind die Proteinmoleküle mit kleinen Molekulargewichten, Albumin und γ-Globulin. Hat sich auf Grund der Permeabilitätsstörung ein neues Blut-Gewebs-Eiweißgleichgewicht hergestellt, werden die Eiweißbestände des Serums wieder erneuert. Daß auch der Albuminbestand wieder aufgefüllt wird, zeigt, daß die Albuminsynthese in der Leber nicht erloschen ist. Wie bei allen akut-entzündlichen Prozessen steigen die α-Globuline deutlich an, während die β-Fraktion sich praktisch nicht verändert. Auffallend ist das Verhalten der γ-Globuline. Als einziger Serumeiweißkörper, dessen Synthese unabhängig von der Funktion der Leber verläuft, steigen sie gewöhnlich bei Leberschäden auf Grund eines bisher unbekannten Mechanismus an. Das geht aber nur, wenn das reticulo-endotheliale System, die wahrscheinliche Bildungsstätte der γ-Globuline, nicht geschädigt ist. Aus dem kontinuierlichen Absinken der Globuline mit zunehmend langer Allylformiat-Verabfolgung schließen wir, daß die Vergiftung über die Leber hinaus auch das RES schädigt. Einen Anhaltspunkt haben wir in der Leber selbst, in der auch die zum RES gehörigen Zellen pathologische Veränderungen aufweisen.

Die Abweichungen der Aktivität der hier untersuchten Fermente sind sicher Ausdruck der Leberschädigung. Eine eindeutige Erklärung der direkten Ursache der Störungen ist jedoch nicht möglich. Die Schwierigkeit der Deutung des initialen Q_{O_2}-Anstieges als Zeichen eines „Entzündungsstoffwechsels" ist solange unbefriedigend, als damit nur ein phänomenologischer, aber kein kausaler Zusammenhang ausgedrückt ist.

Keineswegs kann aus dem erhöhten O_2-Verbrauch in vitro ohne weiteres auf einen solchen in vivo geschlossen werden; die Versuche besagen nur, daß das Lebergewebe mehr Sauerstoff veratmen kann, nicht daß es das im lebenden Organismus wirklich tut. Ein möglicher Rückschluß auf die Verhältnisse im lebenden Organismus ist allenfalls, daß infolge der Permeabilitäts- und Durchblutungsstörungen ein Sauerstoffdefizit entstanden ist. Sollte jedoch in anders aufgebauten Versuchen ein erhöhtes O_2-Bedürfnis oder ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch in vivo erwiesen werden, so könnte man daraus auf eine Enthemmung der für die Gewebsatmung verantwortlichen Fermentkomplexe schließen. Auf Grund der vergleichenden histologischen Untersuchungen können wir uns der Auffassung von Benda, Locker u. Rissel, daß die Gewebsatmung auf dem Höhepunkt der „Desintegration und Homogenisierung" des Gewebes durch Freisetzung der Fermente am größten ist, nicht anschließen. Vielmehr ist zum Zeitpunkt des gesteigerten O_2-Verbrauchs das Leberzellbild noch weitgehend intakt. Mit fortschreitender Degeneration und Cirrhose sinkt dann der Sauerstoffverbrauch, offenbar als Ausdruck einer direkten Zerstörung der Fermente oder der sie bindenden Strukturen.

Die Erhöhung der Triacetinspaltung und der Phosphataseaktivität in allen Phasen der Allylformiatvergiftung geht sicher nicht auf eine quantitative Vermehrung der beteiligten Fermente, sondern nur auf deren Aktivitätssteigerung zurück.

Bei der alkalischen Phosphatase könnte man an eine Aufstauung in der Leber denken, da am Menschen bei ähnlichen Leberschäden eine Ausscheidungsinsuffizienz von alkalischer Phosphatase mit Erhöhung im Blut bekannt ist. Wie bei der gesteigerten Gewebsatmung, so muß allerdings auch bei der Erhöhung der Spaltungsfähigkeit für Triacetin und der Phophataseaktivität an eine aktive Abwehrleistung der Zelle gegenüber der Vergiftung gedacht werden. Dafür spricht, daß diese Aktivitätssteigerungen mit fortschreitender Zelldegeneration wieder nachlassen.

Die Cholinoxydaseaktivität sinkt in den Anfangsstadien der Allylformiatvergiftung ab, um später wieder auf die Ausgangswerte anzusteigen. Eine isolierte Schädigung dieses Fermentkomplexes oder der ihn tragenden Zellstruktur im Gegensatz zu den anderen Fermentsystemen ist unwahrscheinlich. Ein Vergleich mit der Gewebsatmung legt eher den Gedanken eines Konkurrierens der Cholinoxydase und der anderen Atmungsfermente um den Sauerstoff nahe.

Von einer Fermentanarchie im Sinne einer völligen Regellosigkeit der Fermentleistungen kann in den vorliegenden Untersuchungen nicht gesprochen werden. Einer Phase der vorwiegenden Aktivitätssteigerungen folgt schließlich mit fortschreitender Zelldegeneration ein Absinken der Aktivität. Wir glauben nicht an eine direkte Hemmung der Fermentsysteme durch das Allylformiat. Diese müßte sich schon zu Beginn der Intoxikation bemerkbar machen. Vielmehr scheint es sich um fortschreitende Zerstörungen der Zellstrukturen zu handeln, an denen die Fermente verankert sind. Das würde auch erklären, daß die einzelnen Fermentaktivitäten zeitlich und quantitativ kein paralleles Verhalten im Laufe der Versuche zeigen. Das liegt möglicherweise an der unterschiedlichen Verteilung der einzelnen Fermente an den verschiedenen Zellstrukturen.

So ist z. B. das Cytochrom C fast gleichmäßig auf Mitochondrien (50%) und Zellplasma (35—45%) verteilt (Schneider u. Hogeboom). Die Cholinoxydase findet sich zu 68—85% in den Mitochondrien (Kensler u. Langemann). Die alkalische Phosphatase ist bis zu 40% an den Zellkern gebunden (Ludewig u. Chanutin), zu 17—20% an die Mitochondrien (Novikoff, Podber u. Ryan) und zu 55—80% an das Zellplasma. Die Esterasen sind vorwiegend in den Mikrosomen (47—58%) zu finden (Omachi, Barnum u. Glick).

Daraus folgt, daß die einzelnen Fermentsysteme sehr individuell auf allgemeine Schädigung reagieren können, je nachdem, wie stark die anatomischen Strukturen, an die sie gebunden sind, Schaden leiden.

Zusammenfassung.

Männliche Albinoratten wurden mit 50 mg Allylformiat/kg Ratte/Tag (s.c.) vergiftet. Die Serumeiweißveränderungen wurden wöchentlich kontrolliert. Am Ende jeder Woche wurde eine Gruppe der Tiere getötet; die Nebennieren wurden gewogen, die Lebern histologisch untersucht. In der Leber wurden bestimmt: Gewebsatmung, Cholinoxydaseaktivität, Triacetinspaltung und Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Mit Einsetzen der serösen Entzündung kommt es zu einem Albuminverlust im Serum. Sauerstoffverbrauch, Triacetinspaltung und Phosphataseaktivität nehmen zu; die Cholinoxydaseaktivität sinkt. Mit zunehmender Degeneration, Verfettung und Cirrhose der Leber sinken Sauerstoffverbrauch, Phosphataseaktivität und Triacetinspaltung wieder ab. Der initiale Anstieg der Fermentaktivitäten ist wahrscheinlich Ausdruck eines Abwehrvorganges und einer gesteigerten Zelleistung, das spätere Absinken Folge der Zellzerstörung mit Auflösung der die Fermentsysteme tragenden Strukturen. Der Grund für das zeitlich und graduell unterschiedliche Verhalten der Fermente wird in ihrer Bindung an verschiedene Elemente der Zelle gesucht.

Literatur.

Allard, C., and A. Cantero: Canad. J. Med. Sci. **30**, 295 (1952). — Antweiler, H. J.: Kolloid. Z. **115**, 130 (1949). — Benda, L., A. Locker u. E. Rissel: Z. exper. Med. **117**, 519 (1951). — Deane, H. W.: Amer. J. Anat. **80**, 321 (1947). — Eger, W.: Zbl. Path. **91**, 255 (1954). — Eppinger, H.: Die Leberkrankheiten. Wien: Springer, 1937. — Die Permeabilitätspathologie. Wien: Springer, 1949. — Hartmann, F., u. G. Schumacher: Z. Naturforsch. **5b**, 384 (1950). — Hartmann, F., u. K. Steinebach: Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 568 (1950). — Herlant, M., and P. S. Timiras: Endocrinology (Springfield, Ill.) **46**, 243 (1950). — Kensler, C. J., and H. Langemann: J. of Biol. Chem. **192**, 551 (1951). — Kerr, L. M. H., I. G. Campbell and G. A. Levvy: Biochemic. J. **46**, 278 (1950). — Kirberger, E., u. G. Martin: Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 268 (1950). — Klein, W.: Z. physiol. Chem. **254**, 1 (1938). — Koch-Weser, D., E. Faber, P. B. Stanto and H. Popper: Federat. Proc. **9**, 336 (1950). — Kochakian, C. D., and M. N. Bartlett: J. of Biol. Chem. **176**, 243 (1948). — Koller, F., H. Rosenmund u. A. Zuppinger: Helvet. med. Acta **15**, 356 (1948). — Krüskemper, H. L., u. W. Dirscherl: Biochem. Z. **323**, 512 (1953). — Lang, K.: Der intermediäre Stoffwechsel. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer, 1952. — Ludewig, S., and A. Chanutin: Arch. of Biochem. **29**, 441 (1950). — Mark, D. D.: Arch. of Path. **49**, 545 (1950). — Miller, L. L.: J. of Biol. Chem. **172**, 113 (1948). — Novikoff, A. B., E. Podber and J. Ryan: Federat. Proc. **9**, 210 (1950). — Omachi, A., C. P. Barnum and D. Glick: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **67**, 133 (1948). — Pätau, K.: Z. Biol. **63**, 152 (1943). — Rona, P., H. Petow u. H. Schreiber: Klin. Wschr. **1922**, 2366. — Schaller, K.: Z. klin. Med. **141**, 565 (1942). — Schneider, W. C., and G. H. Hogeboom: J. of Biol. Chem. **183**, 123 (1950). — Selye, H.: Stress, Montreal, Acta Inc., 1950. — Sherlock, S., and V. Walsche: J. of Path. **59**, 615 (1947). — Stucki, D.: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 487. — Viollier, G.: Helvet. chim. Acta **31**, 387 (1948). — Wachstein, M.: Arch. of Path. **40**, 57 (1945). — Wachstein, M., and F. G. Zak: Arch. of Path. **42**, 501 (1946). — Wohlgemuth, J.: Klin. Wschr. **1929**, 1253.

Dr. H. L. Krüskemper und Priv.-Doz. Dr. F. Hartmann,
Göttingen, Medizinische Universitätsklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224. S. 285—294 (1955).

Aus der I. Med. Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. K. Bingold).

Die Wirkung von Natriumfluorid auf die renale Ausscheidung von p-Aminohippursäure, Kreatinin, Chlorid und Harnstoff beim Hund.

Von
H. Schwalb, A. Bauernfeind und H. Hensel.

(Eingegangen am 12. Oktober 1954.)

Es kann heute als gesichert gelten, daß in der Niere die Arbeit der Tubuluszellen, besonders der Transport von Substanzen, sei es als Resorption aus dem Primärharn oder als Sekretion in das Tubuluslumen, in den Zellen einen normalen Ablauf biochemischer Prozesse voraussetzt und besonders solcher, die zur Energiegewinnung dienen.

Dies geht aus zahlreichen Untersuchungen über die Folgen experimenteller Stoffwechselschädigungen für die Nierenfunktion hervor, sei es durch Unterbrechung des Blutstroms (Marshall u. Crane), durch Unterkühlung der Nieren (Bickford u. Winton) oder durch Anwendung von Fermentgiften, durch welche besonders die tubuläre Sekretion verschiedener Stoffe gehemmt wird, z. B. bei Blockierung der Häminproteide des Warburg-Keilin-Systems mit Cyanid (Nicholson, Beyer u. Mitarb.), bei Hemmung der Cytochromoxydase mit Phenylhydrazin (Beyer u. Mitarb.), bei Entkoppelung von Oxydation und Phosphorylierung mit Dinitrophenol (Taggart u. Forster, Mudge u. Taggart), unter dem Einfluß von Benemid und Carinamid (Beyer u. Mitarb.) und schließlich bei Blockierung der Succinoxydase durch Dehydroessigsäure und Malonsäure (Shideman u. Rene).

Als Energiequelle für aktive Zelleistungen sind nun bekanntlich energiereiche Phosphatbindungen zu betrachten (Lipman), die in erster Linie durch Atmungskettenphosphorylierung bei der Oxydation der Brenztraubensäure gewonnen werden. Aber auch bei der anaeroben Glykolyse entstehen energiereiche Phosphatbindungen, die als Energiequelle in Frage kommen können. So werden nach Avidson u. Hawkins bei der Spaltung der 1,3-Diphosphoglycerinsäure 16250 cal., bei der Spaltung der Phosphoenolbrenztraubensäure 15900 cal. an freier Energie gewonnen.

Eine Substanz, welche als Enzymgift auf verschiedene Weise in Reaktionen des Energiestoffwechsels eingreift und in besonderem Maße die anaerobe Glykolyse hemmt, ist das Fluorid, das bei der Erforschung des intermediären Stoffwechsels große Bedeutung erlangt hat.

Natriumfluorid hemmt die Enolase (Lohmann u. Meyerhof), welche bei der Reaktion zwischen 2-Phosphoglycerinsäure und Enol-Phosphobrenztraubensäure als Katalysator beteiligt ist. Dadurch kann die Milchsäurebildung völlig unterbunden werden.

Nach Warburg wird die Enolasehemmung durch Fluorid durch eine Komplexbildung zwischen Magnesium, Fluorid und Phosphat bewirkt, wodurch das für die Aktivität der Enolase notwendige Magnesium von dieser verdrängt wird. Diese Wirkung des Fluorids auf die Glykolyse wurde außer im Muskel auch in anderen Organen nachgewiesen (Botazzi u. Onorato), u. a. in der Leber (Browne u. Grant), von Peskina u. Utersky in der Nebenniere und schließlich auch in der Niere (zit. nach Eichler).

Eine der Enolasehemmung ähnliche Wirkung des Fluorids ist die Inaktivierung der Phosphoglucomutase bei der Umsetzung von Glucose-6-Phosphat in Glucose-1-Phosphat. Es kann weiterhin die Spaltung der Adenosintriphosphorsäure (ATP) durch Inaktivierung der ATP-ase verhindern (Barrenscheen u. Lang), die jedoch für Fluorid etwas weniger empfindlich zu sein scheint als die Enolase. An Nierenpräparaten von Hühnern und Ratten beobachteten Potter u. Elvehjem eine um 10% verminderte Sauerstoffaufnahme bei Anwesenheit von m/100 NaF. Darüber hinaus sind über das Fluorid noch zahlreiche andere Hemmwirkungen auf Fermente des Stoffwechsels bekannt.

In Anbetracht der bedeutenden Wirkung des Fluorids auf den Zellstoffwechsel und insbesondere auf solche Vorgänge, die für die Energiegewinnung und Energieverwertung wesentlich sind, muß angenommen werden, daß auch die Toxicität des Fluorids im Organismus zum großen Teil dadurch bedingt ist. Es darf also erwartet werden, daß unter der Wirkung von Natriumfluorid auch in der Niere solche Funktionen gehemmt werden, die in besonderem Maße einen normalen Ablauf der erwähnten Stoffwechselmechanismen zur Voraussetzung haben. Schließlich schien uns eine Untersuchung der Fluoridwirkung auf die Nierenfunktion auch von toxikologischem Interesse zu sein, zumal darüber unseres Wissens noch wenig bekannt ist und Fluoridvergiftungen heute in der Arbeitsmedizin eine Rolle spielen.

Die Fluoridwirkung wurde untersucht auf die Ausscheidung der p-Aminohippursäure, des endogenen Kreatinins, des Harnstoffs und der Chloride, um möglichst verschiedene Ausscheidungsmechanismen in der Niere zu erfassen.

Methodik.

Die Analysen erfolgten für Kreatinin nach der Methode von Popper, Mandel u. Mayer, für Harnstoff nach der Mikrodiffusionsmethode von Conway, für Chlorid im Harn nach Volhard, im Serum nach Neubauer und für die p-Aminohippursäure nach Smith u. Mitarb. Zur Beurteilung der p-Aminohippursäureausscheidung, deren Größe naturgemäß von der jeweiligen Zufuhr abhängt, wurde auch die Clearance errechnet nach der Formel: Clearance PAH $\frac{U \cdot V}{P}$, wobei U = Konzentration der PAH im Harn, V = Harnvolumen ml/min und P = Konzentration der PAH im Plasma ist. Die Clearance der PAH kann mit ziemlicher Sicherheit als Maß einer tubulären Sekretion und innerhalb einer Serumkonzentration von 2—3 mg% als annähernde Größe des Nierenplasmadurchflusses betrachtet werden.

Die Clearance von Harnstoff, Kreatinin und Chlorid wurde ebenfalls berechnet zur Bestimmung des Exkretionsindex der Chloride und des Harnstoffs; damit läßt sich zunächst die Beziehung der Chlorid- und Harnstoffausscheidung zu der des

Kreatinins beurteilen. Wenn man die Kreatininclearance als Maß für das Glomerulusfiltrat betrachten will, dann ergibt sich aus dem Exkretionsindex das Verhältnis der Chlorid- und Harnstoffausscheidung im definitiven Harn zu der in den Glomeruli filtrierten Chlorid- und Harnstoffmenge:

$$\text{Exkretionsindex für } x \text{ in Prozent} = \frac{\text{effektive Ausscheidung/min}}{\text{filtrierte Ausscheidung/min}} = \frac{Ux \cdot V \cdot 100}{F \cdot Px},$$

wobei U = Konzentration von x im Harn,
P = Konzentration von x im Plasma,
V = Harnvolumen ml/min,
F = Kreatininclearance/min als angenommenes Glomerulusfiltrat.

Die mit diesen Formeln errechneten Werte kommen in einer eigenen Tabelle von den tatsächlichen Meßergebnissen getrennt zur Darstellung, um diese von theoretischen Begriffen fernzuhalten. Lediglich die Clearance der p-Aminohippursäure wurde aus den dargelegten Gründen von vornherein an Stelle der p-Aminohippursäure-Ausscheidung im Harn angeführt. Dargestellt wird ferner das Verhältnis zwischen Kreatinin- und p-Aminohippursäureclearance.

Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden an 10 Schäferhundbastarden (zwischen 20 und 33 kg) durchgeführt. Zu Beginn erhielten die Tiere 0,05 g Morphinum hydrochloricum subcutan, anschließend pro kg 0,25 ml Pernocton i.v. Darauf i.v. Injektion von 2,0—5,0 ml 20%ige Lösung von p-aminohippursaurem Natrium, alle weiteren 30 min subcutane Injektionen von jeweils 2,0 ml. Einführung von Ureterenkathetern durch die eröffnete Blase. Dauertropfinfusion mit 5%iger Traubenzuckerlösung während der Dauer des Versuches. 15 min nach Versuchsbeginn erste Blut- und Harnentnahme, weitere nach ungefähr 20 min. Nach einer genügend langen Vorbeobachtung (von etwa 75 min nach Versuchsbeginn) erfolgte nach der 3. Blutentnahme die i.v. Injektion von 3%iger Natriumfluoridlösung in einer Dosierung von 20—64 mg NaF pro kg Körpergewicht. Bei einigen Hunden wurden am Ende des Versuches die Nieren exstirpiert und histologisch untersucht.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt.

1. Die Harnmengen nahmen nach Fluorid in 7 von 10 Versuchen mehr oder weniger zu, zweimal erfolgte keine verwertbare Änderung, in einem Fall ging sie beträchtlich zurück.

Die Größe der Wasserausscheidung war auch nach Fluorid zum Teil abhängig von der Flüssigkeitszufuhr durch die Tropfinfusion. So wurde bei Versuch 6, der eine starke Abnahme der Harnmengen aufwies, insgesamt nur 300 ml Traubenzucker infundiert gegenüber den anderen Versuchen mit durchschnittlich 1000 ml in demselben Zeitraum. In Anbetracht dieser immerhin bedeutenden Flüssigkeitszufuhr kann auch die Zunahme der Wasserausscheidung nicht mit Sicherheit auf die Fluoridwirkung zurückgeführt werden. Andererseits war die Zufuhr von Flüssigkeit meist zur Stützung des Kreislaufs notwendig. In einem Versuch (3) versiegte die Harnausscheidung nach der Fluoridinjektion etwa 3 min; diese Anurie konnte rasch durch Vermehrung der infundierten Flüssigkeitsmenge beseitigt werden. Die Vermehrung der Harnmenge war meist mit einem beträchtlichen Rückgang der Kreatinin- und p-Aminohippursäureausscheidung verbunden.

Tabelle 1. *Ausscheidung und Serumkonzentrationen von Kreatinin, Chlorionen und Harnstoff und Clearance der p-Aminohippursäure vor und nach intravenöser Injektion von Natriumfluorid.*

Versuch Körpergewicht, Alter	Periode	Dauer	Harnvolum.	Kreatinin		Chloride		Harnstoff		p-Aminohippursr. Clearance	Zeitpunkt der Injektion, Dosis NaF
				Ser. konz.	Aussch.	Ser. konz.	Aussch.	Ser. konz.	Aussch.		mg/kg
		min.	ml/min	mg%	mg/min	mg%	mg/min	mg%	mg/min	ml/min	Körpergew.
1.	1.	21	1,18	0,91	1.01	369	0,052	37,1	19,2	195,0	
24 kg	2.	22	1,36	0,905	0,94	367	0,055	37,6	16,1	205,0	
5 J.	3.	14	1,93	0,91	1,01	364	0,091	36,5	14,6	237,0	20,8
	4.	9	3,69	0,91	1,13	369	0,188	36,5	15,5	213,5	
	5.	6	4,73	0,915	1,18	374	0,160	36,3	18,5	205,5	
	6.	6	5,13	0,915	1,11	373	0,180	35,8	18,4	204,0	
2.	1.	29	1,09	1,82	1,39	390	0,021	45,2	26,9	150,8	
22 kg	2.	20	1,74	1,86	1,34	389	0,016	44,8	24,7	142,7	
2 J.	3.	30	1,03	2,02	0,56	387	0,022	45,1	8,9	108,3	45,5
	4.	15	2,30	2,25	0,78	377	0,056	45,6	10,7	120,1	
	5.	17	1,99	2,39	0,54	369	0,038	46,1	7,9	79,2	
	6.	15	2,10	2,49	0,53	367	0,039	46,6	7,2	86,7	
3.	1.	27	0,27	1,11	1,53	391	0,015	35,4	11,5	302,3	
33 kg	2.	23	0,32	1,08	1,25	386	0,014	36,1	12,8	281,0	41,2
7 J.	3.	25	0,78	1,12	0,69	379	0,019	35,8	6,5	150,1	
	4.	8	2,83	1,17	1,88	366	0,073	35,8	14,6	222,8	
4.	1.	20	2,10	1,69	1,42	360	0,042	43,3	20,6	150,5	
25 kg	2.	16	2,39	1,70	1,44	361	0,044	43,5	21,5	144,5	
4 J.	3.	18	2,14	1,78	1,12	365	0,043	43,7	13,6	112,2	32,0
	4.	19	2,10	1,90	0,98	365	0,079	43,8	12,9	113,8	
	5.	15	3,00	1,95	1,12	359	0,155	43,7	12,0	127,7	
5.	1.	27	1,35	1,48	1,50	369	0,358	25,1	14,6	178,0	
24 kg	2.	17	2,09	1,51	1,29	367	0,292	24,5	10,26	216,5	
2 J.	3.	19	1,79	1,64	0,80	370	0,130	24,0	8,84	210,0	29,2
	4.	18	2,03	1,81	0,77	380	0,031	24,1	9,41	186,5	
	5.	18	1,68	1,99	0,58	379	0,024	24,4	6,36	126,3	
6.	1.	35	0,90	1,36	1,25	388	0,016	35,8	14,90	194,0	
32 kg	2.	26	1,77	1,37	1,14	388	0,023	35,8	16,18	214,3	
4 J.	3.	35	0,78	1,54	0,64	388	0,068	35,7	5,96	148,0	37,5
	4.	39	0,72	1,83	0,66	383	0,167	35,8	6,32	133,3	
	5.	35	0,34	2,15	0,25	396	0,200	36,0	2,56	44,1	
7.	1.	16	1,72	0,93	1,12	400	0,163	16,3	9,40	332,5	
28 kg	2.	23	1,65	0,95	1,23	398	0,187	16,4	9,35	342,5	43.0
2 J.	3.	15	2,45	0,98	0,98	398	0,251	16,6	8,29	387,5	
	4.	10	3,28	0,98	0,90	405	0,248	16,7	9,83	375,5	
8.	1.	20	0,47	1,30	1,14	365	0,106	24,0	12,45	222,0	
25 kg	2.	20	0,70	1,27	1,02	370	0,200	23,7	14,60	267,0	64,0
2 J.	3.	17	1,57	1,44	0,62	368	0,198	23,7	7,54	165,3	
	4.	15	1,90	1,73	0,57	365	0,247	24,1	7,15	141,7	

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Versuch Körpergewicht, Alter	Periode	Dauer	Harnvolum.	Kreatinin		Chloride		Harnstoff		p-Aminohippursr. Clearance	Zeitpunkt der Injektion, Dosis NaF
				Ser. konz.	Aussch.	Ser. konz.	Aussch.	Ser. konz.	Aussch.		
		min	ml/min	mg%	mg/min	mg%	mg/min	mg%	mg/min	ml/min	mg/kg Körpergew.
9.	1.	40	0,21	0,93	1,12	399	0,025	22,0	11,49	344,1	
27 kg	2.	31	0,30	0,93	1,17	399	0,023	21,8	12,60	335,0	
3 J.	3.	19	1,73	0,95	0,81	396	0,182	22,0	13,57	311,0	44,4
	4.	7	4,90	0,96	0,83	394	0,290	22,0	13,63	299,5	
	5.	8	6,05	0,97	0,83	384	0,270	22,1	12,91	236,3	
10.	1.	27	0,36	1,63	1,49	385	0,030	56,8	12,53	361,5	
26 kg	2.	34	0,40	1,62	1,48	385	0,026	56,8	12,92	367,5	
1 J.	3.	28	1,18	1,63	1,01	378	0,061	56,9	12,49	378,0	34,6
	4.	10	3,12	1,63	1,30	366	0,194	56,9	25,70	465,0	
	5.	5	5,53	1,63	1,52	361	0,258	56,9	37,00	490,2	

2. Die Chloridausscheidung war nach Natriumfluorid in 9 von 10 Versuchen deutlich vermehrt; bis auf 2 Versuche stieg sie auf das 2—10fache des Ausgangswertes an; in einem Fall war sie vermindert. Die vermehrte Chloridausscheidung war in der der Fluoridinjektion folgenden Periode am geringsten und stieg mit zunehmender Dauer des Versuches an. Der Blutspiegel der Chloride zeigte entweder keine Änderung oder ein leichtes Absinken.

3. Die Ausscheidung des endogenen Kreatinins verringerte sich bei 8 Versuchen, maximal um 75% des Ausgangswertes; zweimal trat eine geringe Zunahme ein (Versuch 1 und 3). Der Kreatininblutspiegel stieg in 5 Fällen an, besonders bei den Versuchen mit stark verringerter Kreatininausscheidung (z. B. Versuch 2 und 6).

4. Die Harnstoffausscheidung nahm in 5 Versuchen deutlich ab und zwar bis 84%, dreimal ergab sich keine Änderung, einmal ein geringer und bei Versuch 10 ein deutlicher Anstieg über das Dreifache des Ausgangswertes. Eine wesentliche Änderung der Harnstoffkonzentration im Serum erfolgte nicht. Beide Male erfolgte gleichzeitig eine bedeutende Zunahme der Minutenvolumina. Das verschiedene Verhalten von Harnstoff und Chlorid gegenüber der Wasserausscheidung ist auffallend. Die Chloridausscheidung war nämlich auch dann noch gesteigert, wenn die Harnmengen beträchtlich abnahmen.

5. Die Ausscheidung der p-Aminohippursäure nahm bei 5 Versuchen in allen Perioden nach der Fluoridinjektion deutlich ab, maximal um 75% des Ausgangswertes, einmal (Versuch 5) erst 37 min nach der Fluoridinjektion. In den übrigen Fällen erfolgte keine größere Änderung.

Eine Konstanz der p-Aminohippursäurekonzentration im Serum ließ sich nur in wenigen Versuchen erzielen. Bei der Berechnung der Clearance sind jedoch

Änderungen des Blutspiegels berücksichtigt. Soweit die Serumkonzentrationen der p-Aminohippursäure unter 3 mg% lagen, konnten die Clearancewerte vor der Fluorideinwirkung die Größe des Nierenplasmastroms wiedergeben; diese Auslegung ist jedoch unter der Wirkung des Fluorids nicht mehr erlaubt, da eine Änderung der p-Aminohippursäureclearance auch durch eine Änderung der tubulären Sekretion hervorgerufen werden kann.

Zusammengefaßt ergab sich also nach Fluorid als konstanteste und stärkste Änderung eine Vermehrung der Chloridausscheidung, eine Verminderung der Kreatinin- und zum größten Teil auch der Harnstoff- und p-Aminohippursäureausscheidung. Diese Änderungen der Ausscheidung schienen zum Teil reversibel zu sein. Wesentliche Unterschiede im Verhalten der rechten und linken Niere waren bei den Versuchen nicht zu erkennen.

Die histologische Untersuchung der Nierenschnitte einiger Versuchstiere, welche freundlicherweise Herr Dr. Stampfl (Pathologisches Institut der Universität München, Dir. Prof. Dr. Hueck) übernahm, gab keinen Anhalt für eine Erkrankung der Nieren oder für wesentliche Veränderungen, die als Folge der Fluorideinwirkung hätten entstanden sein können.

Diskussion.

Die Ergebnisse sind sicher nicht allein auf die Stoffwechselwirkung des Fluorids zurückzuführen. So ist zu berücksichtigen, daß das Fluorid auch eine deutliche Wirkung auf den Kreislauf besitzt.

Nach Gottdenker und Rothberger senkt Fluorid bei 0,02 g/kg i.v. den Blutdruck der Katze innerhalb 12 min von 140 auf 90 mm Hg, bei 0,05 g/kg i.v. innerhalb 10 min auf Null. Bei Hunden scheint diese Wirkung allerdings etwas geringer zu sein (Greenwood, Hewitt und Nelson).

Als Ursache der dargelegten Ergebnisse können wir also mit folgenden Faktoren rechnen:

1. Zufuhr von Flüssigkeit und Traubenzucker in physiologischer Konzentration,
2. Wirkung des Fluorids auf den Kreislauf,
3. Stoffwechselwirkung des Fluorids (Hemmung energieliefernder Prozesse und der anaeroben Glykolyse),
4. Affinität des Fluorions als Komplexbildner.

Die Steigerung der Chloridausscheidung kann mit Sicherheit auf den Einfluß des Natriumfluorids zurückgeführt werden. Sie ist mit einer Verminderung der tubulären Rückresorption zu erklären. Dafür spricht, daß die Chloridvermehrung selbst bei erheblicher Abnahme der Harnmengen erfolgte, daß ferner die Chloridkonzentration im Serum eine Tendenz zum Absinken zeigte und sich schließlich die Kreatininclearance völlig gegensätzlich zur Chloridausscheidung verhielt.

Wenn wir auch nicht die Kreatininclearance je Minute als dem Glomerulusfiltrat indentisch betrachten wollen, so dürfte sie doch im

wesentlichen durch den filtrierten Anteil des Kreatinins bestimmt sein. Gegenüber dem sonst bekannten Verhalten der Kreatininclearance ist die unter Fluorid beobachtete Diskrepanz zwischen Chlorid- und Kreatininausscheidung auffällig. Das Verhältnis zwischen Chlorid- und Kreatininausscheidung kommt besonders im Exkreationsindex der Chloride zum Ausdruck, der nach der Fluoridinjektion beträchtlich ansteigt (Tab. 2). Die Verminderung der Chloridrückresorption in den Tubuluszellen ist somit wahrscheinlich. Die einfachste Erklärung dieser Wirkung wäre die einer Hemmung aktiver Zelleistungen des Tubulusepithels. Genügend hohe Fluoridkonzentrationen, wie sie zur Hemmung der Enolase notwendig sind, waren wohl in unseren Versuchen gewährleistet, zumal auch die Ausscheidung von Fluorid nach McClendon und Forster sehr langsam vor sich geht.

Neben der Stoffwechselwirkung wäre freilich noch an andere Mechanismen zu denken, so an eine Indifferenz der Niere zwischen Fluor- und Chlorionen ähnlich dem Verhalten gegenüber Chlor- und Bromionen. Doch müßte dann die vermehrte Chloridausscheidung am stärksten in der der Fluoridinjektion folgenden Periode auftreten, was nicht der Fall ist. So dürfen wir annehmen, daß beim Zustandekommen der verminderten Chloridrückresorption der Wirkung des Fluorids als Enzymgift eine größere Bedeutung zukommt.

Die Ursache für die erhebliche Verminderung der Kreatininausscheidung sehen wir in einer Einschränkung der glomerulären Filtration. Zwar wissen wir wegen fehlender Druckmessungen nicht, ob die blutdrucksenkende Wirkung des Fluorids dafür verantwortlich ist. Tatsache ist aber, daß bei jeder stärkeren Blutdrucksenkung die Kreatininclearance eingeschränkt wird und zwar in einem größeren Ausmaß als die Clearance der p-Aminohippursäure. Eine direkte Beeinflussung der Glomeruli im Sinne einer verminderten Permeabilität ist wohl nicht wahrscheinlich, da sich an diesen mikroskopisch keine Veränderungen feststellen ließen.

Im Vergleich zum Kreatinin wurde die Harnstoffausscheidung durch Fluorid weniger vermindert. Bei Annahme einer ausschließlichen Kreatininfiltration und einer normalerweise stattfindenden Harnstoffrückresorption würde demnach der Harnstoff nach Fluorid etwas vermindert rückresorbiert werden: die Exkretionsindices des Harnstoffs steigen also wie die der Chloride an, nur nicht in demselben Ausmaß (Tab. 2). Wenn die tubuläre Rückresorption des Harnstoffs gegenüber der der Chloride wesentlich weniger durch Fluorid beeinflußt wird, so entspricht das der Tatsache, daß der Harnstoff die am leichtesten diffusionsfähige Substanz ist, deren cellulärer Transport deshalb wohl am wenigsten einen energieverbrauchenden aktiven Vorgang darstellt. Schließlich kommt auch noch die bekannte enge Beziehung zwischen Harnstoff- und

Tabelle 2. *Exkretionsindex von Chlorionen und Harnstoff und Verhältnis zwischen Kreatinin- und p-Aminohippursäure-Clearance vor und nach intravenöser Injektion von Natriumfluorid.*

Versuch	Chloride	Harnstoff	Verhältnis zwischen p-Aminohippursäure- und Kreat.-Clearance
1	0,0127	46,7	54,2
	0,0145	41,2	47,5
	0,0226	28,2	43,2
	0,0418	34,3	54,0
	0,0376	39,4	58,5
	0,0402	43,5	55,3
2	0,00738	76,6	51,1
	0,00596	76,6	50,8
	0,0209	72,0	24,6
	0,04373	68,8	28,6
	0,0452	74,9	28,9
	0,0479	71,6	25,2
3	0,0028	23,8	45,3
	0,0027	30,8	41,0
	0,00327	30,1	44,0
	0,0126	26,0	71,7
4	0,0138	55,4	55,8
	0,0145	58,9	58,2
	0,020	49,9	56,1
	0,0413	55,3	46,5
	0,0688	44,33	46,1
5	0,1073	56,8	56,8
	0,0987	52,0	39,8
	0,0741	80,9	23,1
	0,01903	91,7	22,9
	0,02173	89,0	23,4
6	0,00459	45,4	47,3
	0,00709	54,3	38,9
	0,045	39,4	28,5
	0,1228	48,5	27,7
	0,4418	61,3	26,3
7	0,0339	47,5	36,6
	0,0368	44,2	37,9
	0,0643	49,9	25,7
	0,0647	63,9	24,5
8	0,0333	59,2	39,4
	0,0709	77,3	29,7
	0,127	74,4	25,4
	0,209	90,4	23,2

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Versuch	Chloride	Harnstoff	Verhältnis zwischen p-Aminohippursäure- und Kreat.-Clearance
9	0,0514	43,4	35,2
	0,0468	45,5	37,9
	0,355	72,0	27,8
	0,854	71,8	28,9
	0,83	68,5	36,0
10	0,00861	24,1	25,3
	0,00747	25,0	24,8
	0,0261	35,8	16,4
	0,0666	56,5	16,8
	0,0768	69,6	19,0

Wasserausscheidung unter dem Einfluß des Fluorids zur Geltung; eine absolute Zunahme der Harnstoffausscheidung erfolgte nur dann, wenn gleichzeitig eine erhebliche Mehrausscheidung von Wasser einsetzte, die Kreatininausscheidung aber gleichzeitig nicht vermindert war.

Man könnte daraus den Schluß ziehen, daß die normalerweise erfolgende Harnstoffrückresorption durch Fluorid etwas vermindert wird, daß sich dies aber nur dann in einer absoluten Mehrausscheidung auswirken kann, wenn keine Verminderung des Primärharns stattgefunden hat und wenn ein genügend großer Wasserstrom in den Tubuli den Harnstoff mitnimmt. Dieses Verhalten gegenüber der Wasser- und Kreatininausscheidung spricht unseres Erachtens sehr gegen eine tubuläre Sekretion des Harnstoffs.

Die Ausscheidung der p-Aminohippursäure wird durch Natriumfluorid zum Teil weniger vermindert als die des Kreatinins; man muß die Abnahme der p-Aminohippursäureclearance auf Verminderung des filtrierten Anteils und der gesamten Plasmadurchströmung zurückführen. Bei einer starken Senkung der p-Aminohippursäureausscheidung, wie z. B. in der 3. Clearanceperiode mancher Versuche, ist aber eine Minderung der tubulären Sekretion sicher beteiligt gewesen. Quantitativ betrachtet war sie aber nicht so ausgeprägt, wie es bei Anwendung von anderen Fermentgiften manchmal gefunden wurde. Trotz teilweise sehr hoher Fluoriddosierung ließ sich offenbar das Sekretionssystem der p-Aminohippursäure nicht völlig hemmen.

Zusammenfassung.

An zehn Hunden wurde die Wirkung von intravenös verabreichtem Natriumfluorid auf die renale Ausscheidung von Kreatinin, Harnstoff, Fluorid und p-Aminohippursäure, sowie auf deren Serumkonzentration untersucht.

Die Clearance der p-Aminohippursäure wurde durch Natriumfluorid bis 75% vermindert, etwa im gleichen Ausmaß die des Kreatinins, etwas

weniger die Harnstoffausscheidung. Demgegenüber erfuhr die Chloridausscheidung fast regelmäßig eine starke Vermehrung auf das 2—10fache bei gleichzeitig gesteigerter, manchmal aber auch verminderter Harnmenge. Die Änderung der Ausscheidung wird mit einer Abnahme der Glomerulusfiltration und gleichzeitiger Verminderung der tubulären Rückresorption erklärt.

Die verschiedenen Möglichkeiten des Wirkungsmechanismus von Natriumfluorid werden besprochen. Neben einer Wirkung auf den Kreislauf ist der Einfluß des Natriumfluorids als Enzymgift auf den Zellstoffwechsel die nächstliegende Ursache für die Änderungen der Harnzusammensetzung; es kann sich dabei um eine energetische (fermentative) Insuffizienz der Tubuluszellen handeln, die zu einer starken Hemmung der Chloridrückresorption und zu einer geringeren Hemmung der p-Amino-hippursäure-Sekretion führt. Für die vermehrte Chloridausscheidung kommt außerdem eine Verdrängung von Chloriden durch die zugeführten Fluorionen in Betracht.

Die für die Untersuchungen notwendigen operativen Eingriffe wurden an der Chirurgischen Tierklinik der Universität München (Direktor Prof. Dr. Westhues) durchgeführt. Herrn Dr. Lorenz Schmid, der die Operationen freundlicherweise übernahm, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Literatur.

Avidson, A. W. D., and J. D. Hawkins: Quart. Rev. Biol. **5**, 171 (1951). — Beyer, K. H., u. Mitarb.: Amer. J. Physiol. **149**, 355 (1947); **161**, 259 (1950): **166**, 625 (1951); **155**, 426 (1950). — J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **91**, 272 (1950). — Bickford, R. G. B., and F. R. Winton: J. of Physiol. **68**, 326 (1924). — Botazzi, F., u. R. Onorato: Arch. f. Physiol. **1906**, 203. — Browne, J. S. R., u. R. Grant: Biochem. Z. **264**, 163 (1933). — Conway: Biochemic. J. **27**, 430 (1933); **36**, 655 (1933). — Forster, R. P., and J. V. Taggart: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **36**, 251 (1950). - - Frey, E.: Nierentätigkeit und Wasserhaushalt. Springer-Verl. 1951. — Frey, E., u. J. Frey: Die Funktionen der gesunden und kranken Niere. Springer-Verl. 1950. — Gottdenker, F., u. C. J. Rothberger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 24 (1935). — Greenwood, D. A., W. A. Hewitt and V. E. Nelson: J. Amer. Vet. Med. Assoc. **86**, 28 (1935). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **31**, 1037 (1934). — Lipmann, F.: Biochem. Z. **227**, 110 (1930). — Lohmann, K., u. O. Meyerhof: Biochem. Z. **273**, 60 (1939). — Marshall, E. K., and M. M. Crane: Amer. J. Physiol. **64**, 387 (1923). — McClendon, J. F., and W. C. Forster: J. Dent. Res. **26**, 232 (1947). — Mudge, C. H., and J. V. Taggart: Amer. J. Physiol. **161**, 173 (1950); **161**, 191 (1950). — Nicholson, T. F.: Biochemic. J. **45**, 112 (1949). — Peskina u. Utersky: Zit nach Eichler, O., Hdb. d. exper. Pharmakol. Erg. Werk, 10. Bd. Springer-Verl. 1950. — Popper, H., E. Mandel u. H. Mayer: Biochem. Z. **291**, 354 (1937). — Potter, V. R., and E. A. Elvehjem: J. of Biol. Chem. **117**, 341 (1937). — Shideman, F. E., and R. M. Rene: Amer. J. Physiol. **166**, 104 (1951). Smith, H. W., N. Finkelstein, L. Aliminosa, B. Crawford and M. Graber: J. Clin. Invest. **24**, 388 (1945). — Taggart, J. V., and R. P. Forster: Amer. J. Physiol. **161**, 167 (1950). - Warburg, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Berlin 1948.

Dr. H. Schwalb, I. Medizin. Klinik der Universität München.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 295—299 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Hahn).

Zur Aktivierung der sympathischen Überträgerstoffe durch Methyldonatoren.

Von
H. Giertz und I. Iurna.

(Eingegangen am 30. Oktober 1954.)

In den letzten Jahren hat das Interesse an den Beziehungen zwischen Noradrenalin und Adrenalin ständig zugenommen. Noradrenalin ist nicht nur Vorstufe des Adrenalins, sondern fungiert auch selbständig als Inkret des Nebennierenmarkes. Darüber hinaus wurde gefunden, daß gewisse Wirkungen des Adrenalins nur bei Gegenwart von Noradrenalin zustande kommen (Meier u. Bein).

Ist es möglich, durch simultane Gabe von Methyldonatoren die Wirkung des Noradrenalins in eine Adrenalinwirkung umzuwandeln und einen Aufschluß über das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Noradrenalin-Methylierung im Organismus zu erhalten?

Einige Autoren (Forst und Deininger, Giertz und Schild) stellten bereits fest, daß tatsächlich durch gleichzeitige Gabe von Noradrenalin und Methyldonatoren eine Wirkung auftrat, als ob Adrenalin gegeben wäre. Es wurde jedoch von anderer Seite darauf hingewiesen, daß die untersuchten Testobjekte für die Adrenalinwirkung (Mydriasis der Mäusepupille, Hyperglykämie an Kaninchen) in gleicher Weise auch auf höhere Noradrenalindosen ansprechen und daß nicht nur die Noradrenalinwirkung, sondern auch die Wirkung von Adrenalin durch Methyldonatoren verstärkt werden kann (Engelhardt, Greeff, Holtz und van Luecken).

Um festzustellen, ob eine Umwandlung der Noradrenalinwirkung in eine Adrenalinwirkung durch Methyldonatoren wirklich auf eine Methylierung zurückzuführen ist, muß folgendes untersucht werden:

1. Verstärkt der Methyldonator nur die Noradrenalinwirkung oder auch die Adrenalinwirkung? 2. Vermag ein Methylierungsaktivator, die Adenosintriphosphorsäure, den Methyldonatoreffekt zu verstärken? 3. Ist das Vorhandensein der labilen Methylgruppe für die Verstärkung des Effektes verantwortlich oder handelt es sich um eine unspezifische Wirkung des Methyldonators? 4. Besteht die Möglichkeit, daß eventuell entstandenes Adrenalin in seiner Wirkung durch die Gegenwart von Noradrenalin beeinflußt wird?

Methodik.

Als Maß für die Adrenalinwirkung wurden von uns Änderungen des Blutzuckergehaltes beim nüchternen Kaninchen gewählt.

Die untersuchten Substanzen wurden i.v., bei kombinierten Gaben unmittelbar hintereinander injiziert. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach Hagedorn-Jensen. Die Blutproben wurden vor der Injektion und 5, 10, 15, 20 und 30 min nach der Injektion entnommen, und zwar zu jedem Zeitpunkt 2 Proben, deren Mittelwert wir verwandt haben. Da das Maximum des Blutzuckeranstieges, den wir in Prozent vom Ausgangswert angeben, fast ausnahmslos 10—15 min nach der Injektion lag und dann ein langsamer Abfall erfolgte, haben wir auf die Wiedergabe aller Werte verzichtet, sondern als Kriterien der erfolgten hyperglykämischen Wirkung lediglich den 10 min-Wert angegeben. Jeder Wert ist der Mittelwert aus einer Versuchsserie von meist 10 Versuchen. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ε und die Zahl der Versuche n wird jeweils angegeben.

Tabelle 1.

	A = 0,6 γ je kg N = 6 γ je kg	dazu mg je kg	ATP = 1 mg je kg Adenosintriphosphat	Blutzuckeranstieg in %	n	ε
1.	N	—	—	3,8	12	1,8
2.	„	Methionin 0,1	—	5,4	10	2,9
3.	„	Methionin 1	—	10,9	10	2,8
4.	„	Methionin 30	—	13,8	10	2,3
5.	„	Cholin 0,1	—	2,9	10	1,4
6.	„	Cholin 1	—	10,9	10	2,5
7.	„	Triäthylcholin 1,33	—	4,0	10	2,5
8.	„	Cystein 30	—	2,4	10	1,4
9.	A	—	—	5,8	15	2,2
10.	„	Methionin 30	—	12,4	10	3,4
11.	„	Cholin 1	—	8,8	10	2,1
12.	„	Cystein 30	—	2,3	10	1,8
13.	N	Methionin 0,1	ATP	21,6	10	4,3
14.	„	Cholin 0,1	„	15,5	10	3,2
15.	„	Homocystein 1	„	2,3	5	1,9
16.	A	Methionin 0,1	„	14,1	5	2,8
17.	„	Cholin 0,1	„	11,8	5	3,0
18.	„	Homocystein 1	„	14,7	10	1,4
19.	½ N	Adrenalin $3 \cdot 10^{-4}$	—	21,4	10	2,0
20.	10 A	—	—	23,3	10	4,2

Ergebnisse.

1. Noradrenalin und Adrenalin in Kombination mit Methyldonatoren. Noradrenalin wandten wir in einer Dosis von 6 γ/kg an. Sowohl Methionin (3) als auch Cholin (6) konnten in Dosen von 1 mg/kg die hyperglykämische Wirkung des Noradrenalins verstärken. Beide Substanzen hatten in einer Dosis von 100 γ/kg keinen sicheren Effekt (2,5). 30 mg/kg Methionin waren stärker wirksam als 1 mg/kg (4). Alle angewandten Methionin- und Cholindosen waren an sich blutzuckerunwirksam.

Beide von uns untersuchten Methyldonatoren konnten die Wirkung von 0,6 γ/kg Adrenalin — die der von 6 γ/kg Noradrenalin etwa entsprach —, ebenfalls verstärken (10, 11), jedoch nur in geringerem Ausmaß als die Noradrenalinwirkung.

Tab. 2 gibt an, wievielmal stärker als die Eigenwirkung von Noradrenalin und Adrenalin die Wirkung der Kombinationen mit Methyldonatoren war.

Tabelle 2.

	Noradrenalin 6 γ/kg	Adrenalin 0,6 γ/kg
+ 1 mg/kg Cholin	2,9	1,5
+ 100 γ /kg Cholin	4,1	2,0
+ 1 mg/kg ATP		
+ 30 mg/kg Methionin	3,6	2,1
+ 100 γ /kg Methionin	5,7	2,4
+ 1 mg/kg ATP		

2. Noradrenalin und Adrenalin in Kombination mit Methyldonatoren und Adenosintriphosphat. Dosen von Methyldonatoren (100 γ/kg Methionin bzw. Cholin), die keinen verstärkenden Effekt auf die Noradrenalin- und Adrenalinhyperglykämie hatten, verstärkten bei Gegenwart von Adenosintriphosphat (1 mg/kg) diese Wirkung ganz erheblich (Tab. 2, sowie 13, 14, 16, 17).

Das Adenosintriphosphat und die Kombination des Adenosintriphosphats mit den Methyldonatoren waren am Blutzucker unwirksam. Die Kombination des Adenosintriphosphats mit Noradrenalin ergab ebenfalls keinen sicheren hyperglykämischen Effekt.

3. Noradrenalin und Adrenalin in Kombination mit Äthionin, „Triäthylcholin" (Triäthylaminoäthanol), Cystein und Homocystein. Äthionin erwies sich für unsere Versuche als ungeeignet. In einer Dosis von 30 mg/kg zeigte ein Tier nach der Injektion Vergiftungserscheinungen (Krämpfe, Seitenlage). Kleinere Dosen (10 mg/kg und 1 mg/kg) verursachten einen erheblichen Blutzuckeranstieg. Am Blutdruck der Katze wirkte Äthionin pressorisch. Die Eigenwirkung des Äthionins wird von uns eingehender untersucht, sie gestattet nicht, es mit Methionin in unserer Versuchsanordnung zu vergleichen. Die kombinierte Anwendung von „Triäthylcholin" (1,33 mg/kg = äquimolar mit 1 mg/kg Cholin) und Noradrenalin ergab keine Verstärkung des Noradrenalineffektes (7). 30 mg/kg Cystein verstärkten ebenfalls nicht die Wirkung von 6 γ/kg Noradrenalin oder von 0,6 γ/kg Adrenalin (8, 12). 1 mg/kg Homocystein war in Kombination mit Noradrenalin und Adenosintriphosphat ebenso unwirksam (15). Wurde jedoch in dieser Kombination das Noradrenalin durch Adrenalin ersetzt, so war nun ein deutlicher Effekt festzustellen (18). (Die Wirkung von Homocystein ohne Adenosintriphosphat wurde von uns nicht untersucht.)

4. Kombination von Noradrenalin und Adrenalin. Während 6 γ/kg Noradrenalin bzw. 0,6 γ/kg Adrenalin selbst nur einen geringen hyper-

glykämischen Effekt haben, hat die Kombination von 3γ/kg Noradrenalin und 0,3γ/kg Adrenalin einen so starken hyperglykämischen Effekt wie die 20fache Adrenalindosis allein (19, 20).

Diskussion.

Auf Grund unserer Versuche sind wir der Meinung, daß selbst angesichts der Einwände von Engelhardt, Greeff, Holtz u. v. Luecken die Möglichkeit noch offen gehalten werden muß, daß die verstärkende Wirkung von Methyldonatoren auf die Noradrenalinhyperglykämie durch eine Methylierung des Noradrenalins bedingt ist. Jedenfalls steht es fest, daß die Verstärkung der Noradrenalinhyperglykämie nur durch Stoffe mit einer labilen Methylgruppe, nämlich Methionin und Cholin, nicht aber durch ihre methylfreien Verwandten, nämlich Homocystein, Cystein, sowie Triäthylaminoäthanol zu erzielen ist. Auch die aktivierende Wirkung des Adenosintriphosphats bei Gegenwart von Methyldonatoren auf die Noradrenalinhyperglykämie spricht in gleichem Sinne, da dieser Stoff nach Bülbring sowie Cantoni ein Methylierungsaktivator ist.

Die Tatsache, daß auch die Adrenalinhyperglykämie durch Methyldonatoren verstärkt wird, scheint zwar zunächst ein schwerer Einwand zu sein. Doch können zur Deutung dieses Befundes 2 Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.

Einerseits könnte es sich hier um einen anderen Vorgang handeln. Dafür spricht, daß die Wirkung der Methyldonatoren auf die Adrenalinhyperglykämie schwächer ist[1] und daß auch Homocystein hier im Gegensatz zur Noradrenalinhyperglykämie aktivierend wirkt. Engelhardt u. Mitarb., die einen unspezifischen Effekt von Methionin sowohl auf Adrenalin wie auch auf Noradrenalin annehmen, denken dabei an eine oxydationshemmende Wirkung. Man müßte aber dann erwarten, daß eher noch Cystein und Homocystein in diesem Sinne wirksam wären. Die Wirkungslosigkeit dieser beiden Stoffe gegenüber Noradrenalin und des Cysteins gegenüber Adrenalin bildet jedoch keine Stütze für diese Auffassung.

Andererseits könnte aber auch die Aktivierung des Adrenalins durch Methyldonatoren zu ihrer methylübertragenden Funktion in Beziehung gebracht werden. Es besteht die Möglichkeit, daß neben der Methylierung von Noradrenalin auch eine Entmethylierung von Adrenalin im Körper stattfindet (Schayer u. Mitarb.). Durch Zuführung von Methyldonatoren könnte der hierbei sich bildende Gleichgewichtszustand von Noradrenalin

[1] Das gleiche scheint auch für die mydriatische Wirkung an der Mäusepupille zuzutreffen, wenn man die Befunde von Forst und Deininger mit Noradrenalin und diejenigen von Engelhardt, Greeff, Holtz und v. Luecken mit Adrenalin vergleicht.

und Adrenalin zugunsten des Adrenalins verschoben werden, d. h. es könnte die Entmethylierung des Adrenalins gebremst werden. Wie sich das Verhalten des Homocysteins hier einfügt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

In diesem Zusammenhang gewinnt die von uns gefundene potenzierende Wirkung von Noradrenalin auf die Adrenalinhyperglykämie eine erhöhte Bedeutung, denn sie ist ein Hinweis dafür, daß ein bestimmtes Mischungsverhältnis unerwartete Wirksamkeit entfalten kann. Da dieser Faktor in nicht übersehbarer Weise in unsere Befunde eingeht, so zeichnet sich hier eine gewisse Grenze der Leistungsfähigkeit unserer Methodik ab. Untersuchungen an anderen Testen werden nötig sein, um die Wirkung der Methyldonatoren auf die Noradrenalin- und Adrenalinwirkung definitiv zu klären.

Zusammenfassung.

Die hyperglykämische Wirkung äquieffektiver Noradrenalin- und Adrenalindosen wird durch Methyldonatoren verstärkt, die des Noradrenalins stärker als die des Adrenalins. Dieser Methyldonatoreffekt läßt sich durch Adenosintriphosphat steigern. In den Kombinationen Noradrenalin mit Methionin bzw. Cholin läßt sich das Methionin nicht durch Homocystein (bei Gegenwart von Adenosintriphosphat) oder Cystein, und das Cholin nicht durch „Triäthylcholin" ersetzen. Dagegen verstärkt Homocystein, nicht jedoch Cystein, die Adrenalinhyperglykämie (mit ATP). Eine Mischung unterschwelliger Noradrenalin- und Adrenalindosen kann eine hyperglykämische Wirkung haben, die das Vielfache der Wirkung der Einzelkomponenten beträgt.

Literatur.

Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 234 (1949). — Cantoni, G. L.: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2942 (1952). — Engelhardt, A., K. Greeff, P. Holtz u. R. v. Luecken: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 506 (1954). — Forst, A. W., u. R. Deininger: Klin. Wschr. **1951**, 581. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 378 (1952). — Giertz, H., u. W. Schild: Klin. Wschr. **1952**, 421. — Meier, R., u. H. J. Bein: Helvet. physiol. Acta. **8**, 436 (1950). — Schayer, R. W., and R. L. Smiley: J. of Biol. Chem. **202**, 425 (1953).

Dr. H. Giertz, Düsseldorf, Pharmakol. Institut der Medizinischen Akademie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 300—311 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

Über die Schutzwirkung von Glutathion, Cystein und Dimercaptopropanol bei der Hämolyse durch ultraviolette Strahlen* **.

Von

K. Repke.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Oktober 1954.)

„Die lebende Zelle befindet sich in einem Zustand des labilen Gleichgewichts sowohl in bezug auf ihren Feinbau, ihre Struktur, als hinsichtlich der in ihr sich abspielenden abbauenden und aufbauenden chemischen Prozesse. Die Aufrechterhaltung dieses labilen Gleichgewichts ist nur möglich durch Zufuhr von Energie, die bei der atmenden Zelle Oxydationsenergie ist. Insbesondere dient sie der Summe von Aufbaureaktionen, die dem ständig drohenden Zerfall das Gegengewicht halten" (Riesser[35]). Für die Bedeutung des Stoffwechsels bei der Aufrechterhaltung der Zellstruktur haben sich in den letzten Jahren einige bemerkenswerte Befunde ergeben. Beispielsweise konnte Lutwak-Mann[23] die engen Beziehungen zwischen der strukturellen Integrität der Magenschleimhaut und der Glykolyse ihrer Zellen demonstrieren. Weiter hat Raaflaub[31] gezeigt, daß der Energieüberträger Adenosintriphosphat die Schwellung isolierter Mitochondrien verhindern und dadurch die kompakte Struktur der Zellgranula bewahren kann. Am bemerkenswertesten in diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von Wilbrandt[46] über die Abhängigkeit der Ionenpermeabilität der Erythrocyten vom glykolytischen Stoffwechsel. Dieser Pionierarbeit sind eine größere Zahl von Untersuchungen gefolgt, welche einen aktiven, stoffwechselabhängigen Kationentransport durch die Erythrocytenmembran nahelegen[9, 13, 15, 18, 24, 25, 30, 32, 39, 43]; ältere Literatur bei Ponder[29].

Nun kann nach Bruns, Rummel u. Thielke[7] auch ein über die Norm gesteigerter, oxydativer Kohlenhydratstoffwechsel Energie für die Aufrechterhaltung der relativen Kationenimpermeabilität roter Blutzellen liefern. Die Autoren fanden nämlich, daß der unter Einwirkung des Fermenthemmstoffes Urethan zustandekommende Kaliumverlust durch den Stoffwechselaktivator Cystein weitgehend verhindert werden kann. An diesen Befund knüpft die vorliegende Untersuchung an, bei der jedoch als Maß der Permeabilitätsveränderung die Hämolyse benutzt ist. Es wird die Frage geprüft, ob Sulfhydrylkörper über eine von ihnen bewirkte Steigerung des oxydativen Kohlenhydratabbaues rote Blutzellen vor der Lyse durch ultraviolette Strahlen schützen können. Darüber hinaus liefert die Arbeit weiteres Beobachtungsmaterial für die

* Herrn Prof. Wels zum 65. Geburtstag gewidmet.

** Teilergebnisse dieser Untersuchung wurden auf der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Göttingen am 4. 8. 1952 vorgetragen[33].

neuerdings wieder in Fluß gekommene allgemeinere Diskussion um die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf biologische Objekte (Übersichten von Bacq[1], Errera[10] und Errera u. Herve[11]).

Methoden und Materialien.

Zu den Hämolyse- und Stoffwechselversuchen wurden rote Blutzellen vom Menschen (verschiedene gesunde Spender) verwandt. Das Blut passierte nach Defibrinieren ein Mullfilter, dann wurden die Erythrocyten abzentrifugiert und 2mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. — Bei Versuchen über die Bedeutung der Lichtabsorption des Blutfarbstoffs für das Zustandekommen des Schutzeffekts durch Sulfhydrylkörper wurden auch Methämoglobin-Zellen benötigt. Zu ihrer Herstellung wurde das Blut vor dem Zentrifugieren mit einprozentigem Natriumnitrit im Verhältnis 1 : 1 versetzt. Nach 20minütiger Einwirkung war eine vollständige Umwandlung des Blutfarbstoffs erreicht.

Hämolyseversuche. Um schon bei kurzer Expositionszeit (3—7 min) eine vollständige Hämolyse innerhalb passender Beobachtungszeit (1—3 Std) zu erhalten, wurden dünne Erythrocytensuspensionen (1 : 2000) benutzt. Solche Suspensionen gestatten auch den Hämolyseverlauf direkt ohne weitere Verdünnung mit der von mir benutzten Methodik der Nephelometrie (siehe unten) zu verfolgen. Zur Herstellung der Versuchssuspensionen durch Verdünnung des Erythrocytenbreis diente eine Mischung von 1 Teil isotonischen Phosphatpuffers p_H 7,4 (nach v. Muralt[28]) mit 5 Teilen physiologischer Kochsalzlösung. Diese Suspension wurde in Reagensgläsern aus Quarz (Durchmesser 2 cm) mit der Quarzlampe bestrahlt. Als Strahlungsquelle diente eine Quecksilberdampflampe mit Hochdruckentladung (etwa 1 Atü) und Kippzündung, die einen Betriebsstrom von 4 Amp/220 V Gleichstrom benötigt (Fabrikat A. W. Steinmann, Allersdorf-Königsee). Nach Angaben der Herstellerfirma reichen die emittierten Linien bis ins kurzwellige UV (239 mμ). Die bei den Kurven vermerkten Bestrahlungszeiten geben ein relatives Maß für die angewandten Strahlendosen, die wir in einem absoluten Maß wegen des Fehlens eines geeigneten Geräts nicht messen konnten. Eine Fehlerquelle ergab sich dadurch nicht, da alle Vergleichsansätze zu gleicher Zeit mit derselben Lampe bestrahlt wurden. Um die gleichmäßige Belichtung zu sichern und Wärmeeffekte auszuschließen, wurde die von Wels[11] angegebene Bestrahlungsapparatur benutzt. Die Quarzgläser sind dabei in einem flachen Trichter fast horizontal um einen Mittelpunkt gelagert, um den sie sich mit 15 cm Abstand vom Brenner drehen.

Für die Entscheidung der Frage, ob die Sulfhydrylkörper einen Schutzeffekt auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften oder infolge ihrer physikalischen Filterwirkung ausüben, mußte die Absorption der Quarzlampenstrahlung durch die in Frage kommenden Lösungen geprüft werden. Dazu wurde folgende Anordnung getroffen. Die mit den beschriebenen Erythrocyten-Suspensionen gefüllten Quarzgläser wurden in andere Quarzgläser mit weiterem Lumen eingesteckt, die ihrerseits mit den auf ihre Filterwirkung zu prüfenden Lösungen gefüllt waren, so daß ein Flüssigkeitsmantel um das innere Quarzgefäß gebildet wurde. Bei der fast horizontalen Lage in dem beschriebenen flachen Trichter der Bestrahlungsapparatur wurde das gefüllte innere Gefäß durch sein Gewicht so an den unteren Rand des äußeren Gefäßes gedrückt, daß das von oben kommende Licht eine 2,5 mm dicke Flüssigkeitsschicht durchdringen mußte, ehe es die Erythrocytensuspension des inneren Quarzgefäßes erreichte.

Zur Messung des Hämolyseverlaufs diente das Pulfrich-Photometer für Trübungsmessungen (Carl Zeiß, Jena). Die gemessene Lichtstreuung wird dabei in erster Linie durch die Zahl der suspendierten Erythrocyten bedingt. Das Verfahren

ist denn auch in anderer Form neuerdings zur routinemäßigen Zählung der roten Blutkörperchen eingeführt worden (Loeschcke u. Wever[22]; dort auch weitere Literatur). Im Nephelometer wird die Lichtstreuung nicht nur durch die Zahl, sondern auch durch die Größe und Form der Erythrocyten beeinflußt, was sich bei Hämolyseversuchen darin äußert, daß die Streuung schon vor dem Platzen der Erythrocyten durch deren Schwellung abnimmt. Die beigegebenen Kurven, welche die Kehrwerte der gemessenen, relativen Streulichtintensitäten (vgl. Zeiß-Druckschrift CZG 32—525a—l) in Abhängigkeit von der Zeit wiedergeben, gestatten also den Hämolyseverlauf einschließlich der vorausgehenden Schwellung der roten Blutzellen zu verfolgen. Je niedriger die Trübungskehrwerte liegen, desto mehr Erythrocyten sind der Schwellung und Lyse unterlegen. Das Ausmaß des Kurvenabfalls charakterisiert also die Geschwindigkeit beider Prozesse. — Der austretende Blutfarbstoff spielt für das Ausmaß der Lichtstreuung eine ganz untergeordnete Rolle. Die benutzte Meßanordnung hat für die Beobachtung jeder Hämolyse, bei der wie hier mit dem Austritt verschiedener Blutfarbstoffe gerechnet werden muß, den Vorteil, daß deren verschiedene Lichtabsorption die Ergebnisse nicht beeinflußt. Meßfehler können jedoch bei zusätzlicher Trübung der Ansätze auftreten. Eine Trübung durch denaturiert ausfallendes Hämoglobin wurde weitgehend durch Verwendung frischen Blutes sowie durch kurze Bestrahlungszeit und Versuchsdauer vermieden. Immerhin konnten wegen dieser Fehlerquelle einzelne Kurven nicht bis zum völligen Ablauf der Hämolyse verwertet werden. Trübungen durch zugesetzte Substanzen (ausfallendes Cystin oder oxydiertes Dimercaptopropanol) konnten in den benutzten Konzentrationen vernachlässigt werden. Zur Erkennung und Ausschaltung der genannten Fehlerquellen wurden häufig Kontrollzählungen in der Kammer nach Thoma durchgeführt. Die nephelometrischen Bestimmungen wurden in dem Spezialbecherglas (Durchmesser 26 mm) bei Benutzung des Vergleichsglases Nr. 4 und des Filters L1 vorgenommen (vgl. die schon genannte Zeiß-Druckschrift). Die bei Zimmertemperatur und Luftzutritt stehenden Suspensionen wurden vor jeder Ablesung kräftig umgeschüttelt. Die unbestrahlten Kontrollsuspensionen zeigten in der Beobachtungszeit keine merkliche Hämolyse, so daß ihr Verhalten in den beigegebenen Kurven nicht berücksichtigt zu werden brauchte.

Neben der direkten Beobachtung des Hämolyseverlaufes wurde bei dem größeren Teil der Versuche die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf rote Blutzellen auch mit Hilfe von osmotischen Resistenzkurven (vgl. Wilbrandt[47]) verfolgt, die in geeigneten Abständen nephelometrisch aufgenommen wurden. Die damit erhaltenen Ergebnisse brachten keine zusätzlichen Gesichtspunkte, so daß auf ihre Wiedergabe verzichtet werden konnte. Auf diesem Wege wurde auch sichergestellt, daß Glutathion, Cystein und Dimercaptopropanol in den angewandten Konzentrationen die osmotische Resistenz der Erythrocyten in einer Beobachtungszeit bis zu 8 Std nicht merklich beeinflussen.

Stoffwechselversuche. Der Sauerstoffverbrauch der roten Blutzellen wurde in der Warburg-Apparatur manometrisch gemessen; abgesehen von der Verwendung neutralisierten Cysteinhydrochlorids und Glutathions wurde den speziellen Angaben von Bruns u. Rummel[6] gefolgt. Die von den Thiolen bewirkte Atmungssteigerung wird durch Korrektur der Manometerausschläge um den Wert der reinen SH-Oxydation gefunden. Dieser Wert wurde durch entsprechende, parallellaufende Bestimmungen in Gegenwart von substratverarmten Erythrocyten oder von Hämolysat erhalten, in denen ein Sauerstoffverzehr durch oxydativen Kohlenhydratabbau nicht mehr zustandekommt. Die Verarmung an Substrat (Glucose-6-phosphat) wurde durch mehrfaches, längeres Suspendieren in isotonischer Kochsalzlösung zu erreichen gesucht. Allerdings ist bei Verwendung von Erythrocyten eine Restatmung infolge unzureichenden Substratentzugs nicht immer auszuschließen, während im

Hämolysat die Oxydation der Thiole etwas schneller als bei Gegenwart von roten Blutzellen erfolgt. Doch geben die korrigierten Kurven mit ausreichender Genauigkeit den Verlauf der Atmung unter Einwirkung der Thiole wieder.

Von den benutzten Sulfhydrylkörpern — Cystein hydrochloricum Merck, Glutathion Merck und 2,3-Dimercaptopropanol Hydrierwerke Rodleben — wurden jeweils kurz vor Gebrauch neutrale und isotonische (0,3 molare) Stammlösungen hergestellt. Bei einem Teil der Versuche wurde auch die durch Neutralisation von Cysteinhydrochlorid entstehende Kochsalzmenge bezüglich ihrer osmotischen Wirkung in Rechnung gestellt und dementsprechend die genau blutisotonische 0,104 molare Stammlösung benutzt; für die Versuchsergebnisse ergaben sich aber dadurch keine wesentlichen Abweichungen. Die Stammlösung Dimercaptopropanol wurde aus einer gesättigten wäßrigen Lösung bereitet und jodometrisch eingestellt.

Versuchsergebnisse.

Ausgangspunkt der Untersuchung war die Feststellung, daß Glutathion, Cystein und Dimercaptopropanol rote Blutzellen vor der Lyse durch ultraviolette Strahlen schützen (diese Wirkung wird im folgenden kurz als Schutzeffekt bezeichnet). Das Ausmaß des Schutzeffektes war in gewissen Grenzen abhängig von der Konzentration der Thiole und von der angewandten Strahlendosis. Einen Eindruck von der Wirksamkeit der Schutzstoffe vermittelt die Angabe, daß $7{,}5 \times 10^{-6}$ m Dimercaptopropanol und $1{,}5 \times 10^{-5}$ m Cystein oder Glutathion bei geeigneter Bestrahlungsdauer noch eben schützten. Das Dimercaptopropanol war den anderen beiden Thiolen auch dann überlegen, wenn die Schutzstoffe in der gleichen SH-Konzentration bezüglich ihres Schutzeffektes verglichen wurden (vgl. Abb. 1). Für die Schutzwirkung war die den drei Stoffen gemeinsame SH-Gruppe verantwortlich, denn Alanin — die dem Cystein entsprechende Aminosäure ohne Sulfhydrylgruppe — verzögerte den Hämolyseablauf nicht. Zusatz der Thiole nach der Bestrahlung hatte keine Schutzwirkung. Vielmehr war bei Zugabe von Cystein, das besonders eingehend untersucht wurde, dann sogar eine Beschleunigung des Hämolyseverlaufs erkennbar.

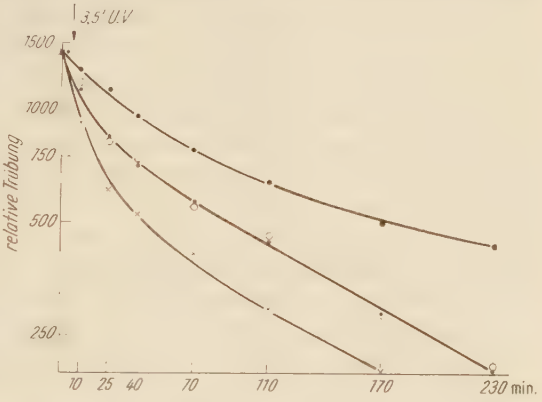


Abb. 1. UV-Hämolyse: •—• 8×10^{-5} m Dimercaptopropanol, ○—○ $1{,}6 \times 10^{-4}$ m Cystein, ·—· $1{,}6 \times 10^{-4}$ m Glutathion, ×—× Kontrolle ohne SH-Körper.

Als Ursache für den Schutzeffekt wurden vor Inangriffnahme des Hauptproblems einige mutmaßlich beteiligte Faktoren geprüft. Zunächst war die Tatsache in Rechnung zu stellen, daß die Schutzstoffe einen Teil des angewandten UV-Lichts absorbieren. Absorbierte Lichtenergie kann bekanntlich in verschiedener Weise transformiert werden.

Für den Fall der Sulfhydrylverbindungen ist durch die Untersuchungen von Bersin[4] und von Weiss u. Fishgold[42] bekannt, daß in wäßriger Lösung Wasserstoff und Disulfid entstehen; darüberhinaus wird ein Teil des Moleküls zerstört[21, 48]. Diese photochemischen Reaktionen selbst dürften für den Schutzeffekt ohne Bedeutung sein. Dagegen war dem Umstand Beachtung zu schenken, daß dabei infolge Lichtabsorption die eingestrahlte Energie geschwächt wird. Tatsächlich liegt die Lichtabsorption der Sulfhydrylverbindungen (Literatur siehe[34]) im kurzwelligen UV unterhalb 300 mμ, also im Bereich des Wirkungsspektrums der Hämolyse[40]. Daher war durchaus in Betracht zu ziehen, daß die Schutzstoffe als inneres Filter oder Lichtschirm (Dhar[8]) für die roten Blutzellen gewirkt haben konnten.

In diesem Sinne hat Whitehead[45] festgestellt, daß der durch Cystein oder Glutathion bewirkte Schutz von Bakterien gegen UV-Strahlen auf rein physikalischer Absorption beruht und daher biologisch bedeutungslos ist. Er schließt dies aus der Beobachtung, daß die Schutzwirkung der Stoffe im Suspensionsmedium die gleiche war wie bei Verwendung der Stoffe als Filter.

Um ein Urteil über den Anteil der in Frage stehenden Filterwirkung der Thiole an dem untersuchten Schutzeffekt zu gewinnen, wurden die Erythrocytensuspensionen durch eine 2,5 mm dicke Flüssigkeitsschicht bestrahlt, welche die auf ihre Filterwirkung zu prüfenden Stoffe enthielt. Mit dieser Anordnung wurde gefunden, daß die ultravioletten Strahlen zwar schon nach Passieren einer, aus der gewöhnlich benutzten Erythrocytensuspension bestehenden, Filterschicht erheblich in ihrer hämolytischen Wirksamkeit geschwächt sind, daß jedoch Thiollösungen als Filter in den hier angewandten Konzentrationen den Hämolyseablauf nicht beeinflussen. Ein merklicher physikalischer Schutzeffekt durch Lichtabsorption kam bei Verwendung von Cystein- oder Dimercaptopropanol-Lösungen (Glutathion wurde nicht untersucht) als Filter erst zustande, wenn das Zehn- oder Hundertfache der bei den eigentlichen Hämolyseversuchen benutzten Konzentration gewählt wurde. Die wesentliche Lichtabsorption liegt also unter den Bedingungen der Hämolyseversuche weit mehr auf Seiten der Erythrocyten als der Thiole. Die Schlußfolgerung, daß der Schutzeffekt der Sulfhydrylkörper nicht durch physikalische Filterwirkung, sondern als Folge ihrer chemischen Aktivität zustandekommt, wird durch die Feststellung unterstrichen, daß beispielsweise Dimercaptopropanol bei Kontakt mit den roten Blutzellen auch dann noch bedeutend wirksamer im Vergleich zu einer Filterlösung dieses Thiols gefunden wurde, wenn die Filterkonzentration 15mal höher gewählt worden war (vgl. Abb. 2).

Beim Zusatz der Thiole zu einer Erythrocytensuspension ist ein Farbwechsel von hellem Rot nach Purpur zu beobachten, der auf dem Über-

gang von Oxyhämoglobin zu Hämoglobin beruht (vgl. dazu KEILIN u. HARTREE[17]). Da nicht geklärt ist, ob beim Zustandekommen der Strahlenhämolyse die Lichtabsorption durch den Blutfarbstoff eine Rolle spielt, war dem beobachteten Farbwechsel bei der Erklärung des Schutzeffektes Beachtung zu schenken. Denn Oxyhämoglobin und Hämoglobin haben zwar in dem hämolytisch wirksamen UV-Bereich beide die Bande bei 270 mμ, doch ist der relative Absorptionskoeffizient des Oxyhämoglobins größer[38]. Daß der Schutzeffekt der Thiole jedoch nicht auf Überführung von Oxyhämoglobin in das im hämolytisch wirksamen Bereich weniger absorbierende Hämoglobin zurückgeht, zeigen Versuche mit Methämoglobinzellen. Für eine solche Untersuchung ist Cystein als Schutzstoff geeignet, da es im Gegensatz zum Dimercaptopropanol in der benutzten Konzentration Methämoglobin in intakten Zellen nicht reduziert und somit ein Farbwechsel wie bei Verwendung von roten Blutzellen nicht in Rechnung gestellt zu werden braucht. Derartige Versuche an Methämoglobinzellen ergaben nun, daß auch unter diesen Versuchsbedingungen der Schutzeffekt des Cysteins nachweisbar ist.

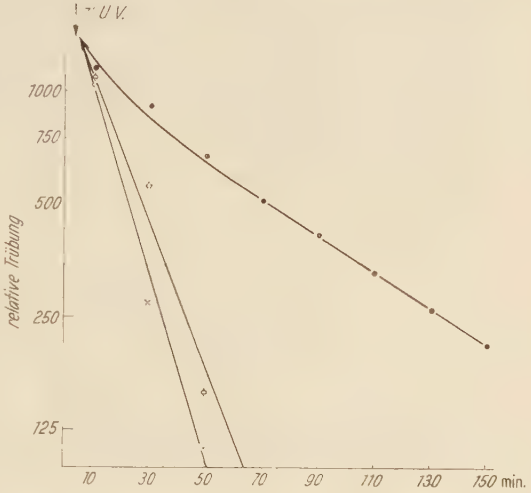


Abb. 2. UV-Hämolyse: •—• 1,0 × 10^{-4} m Dimercaptopropanol in Kontakt mit den Erythrocyten, *—* 1,5 × 10^{-3} m Dimercaptopropanol als Filter, ×—× Kontrolle ohne SH-Körper.

Es konnte jetzt die Frage geprüft werden, ob die Stoffwechselwirkungen der Thiole das Zustandekommen des Schutzeffektes erklären können. Nach der schon erwähnten Untersuchung von BRUNS, RUMMEL u. THIELKE[7] begünstigt Cystein unter Einwirkung des Hämolyticums Urethan die Retention von Kalium-Ionen und damit die Aufrechterhaltung der normalen, relativen Kationen-Impermeabilität des Erythrocyten. Auch die Hämolyse durch ultraviolette Strahlen kommt dadurch zustande, daß die bestrahlten roten Blutzellen vermehrt kationenpermeabel werden[20]: sie läßt sich in dieser Beziehung der Urethanhämolyse durchaus an die Seite stellen. Den Wirkungsmechanismus des Cysteins bei der Retention von Kalium-Ionen suchen die genannten Autoren vor allem in seiner Eigenschaft, die Atmung der Erythrocyten beträchtlich steigern zu können, doch lassen sie auch die Möglichkeit

offen, daß das negative Redoxpotential des Cysteins an der Wirkung beteiligt ist.

Die Beziehungen des Cysteins und Glutathions zum Erythrocytenstoffwechsel haben zuerst Meldrum[26] und Meldrum u. Tarr[27] eingehender untersucht. Sie

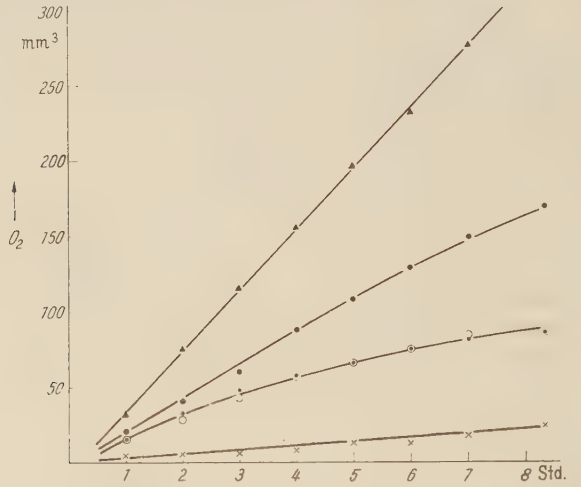


Abb. 3. Atmung roter Blutzellen bei Glucosezusatz ($1{,}5 \times 10^{-2}$ m): ▲—▲ mit $1{,}2 \times 10^{-4}$ m Methylenblau, •—• mit 7.5×10^{-3} m Dimercaptopropanol, ·—· mit $1{,}5 \times 10^{-2}$ m Glutathion, ○—○ mit $1{,}5 \times 10^{-2}$ m Cystein, ×—× Spontanatmung.

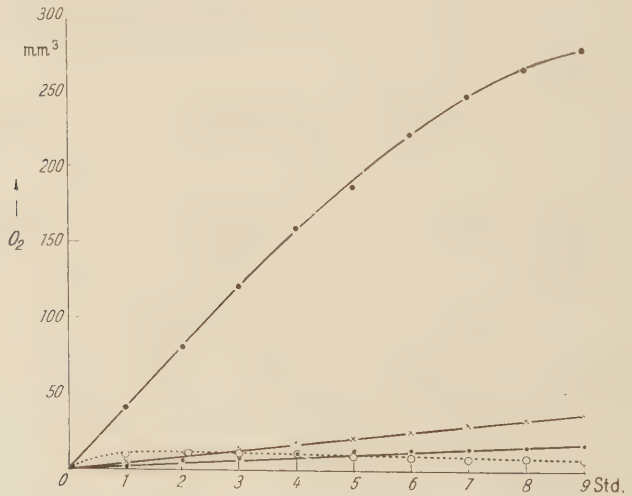


Abb. 4. Atmung substratverarmter, roter Blutzellen: 1. bei Gegenwart von $1{,}5 \times 10^{-2}$ m Dimercaptopropanol: •—• mit Glucosezusatz, ○····○ ohne Glucosezusatz; 2. Spontanatmung: ×—× mit Glucosezusatz, ·—· ohne Glucosezusatz. Glucose $1{,}5 \times 10^{-2}$ m.

konnten feststellen, daß die oxydierten Thiole durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem reduziert werden. Bruns u. Rummel[6] haben dann die atmungsfördernden Wirkungen der beiden Thiole auf rote Blutzellen erkannt. Für Dimercaptopropanol liegt bisher keine entsprechende Untersuchung vor. Die Wirkung dieses Dithiols auf die Gewebsatmung wurde wenig einheitlich gefunden (Barron u. Mitarb.[2]; dort auch weitere Literatur).

Die Förderung der Erythrocytenatmung durch Cystein oder Glutathion ließ sich vollauf bestätigen und auf Dimercaptopropanol erweitern. Bei einem Vergleich der Wirksamkeit der drei Thiole erwies sich das Dimercaptopropanol als überlegen (vgl. Abb. 3). Wie schon Bruns u. Rummel[6] nachgewiesen haben, ist für das Eintreten des Stoffwechseleffekts die Anwesenheit von Glucose notwendig. Daß dies auch für Dimercaptopropanol zutrifft, zeigt die Abb. 4. Diese Feststellung eröffnete

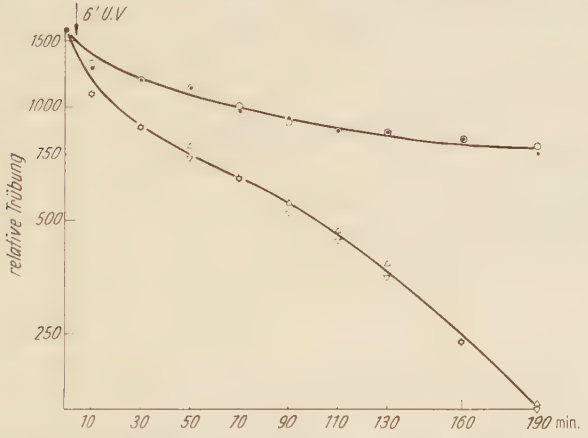


Abb. 5. Hämolyseverlauf an Erythrocyten mit und ohne Stoffwechselaktivität: 1. bei Gegenwart von 5×10^{-4} m Dimercaptopropanol: ·—· mit Glucosezusatz, ○—○ ohne Glucosezusatz; 2. ohne SH-Körper: △—△ mit Glucosezusatz, ▽—▽ ohne Glucosezusatz. Glucose 3×10^{-4} m.

die Möglichkeit, die fragliche Beteiligung der Stoffwechselwirkung der Thiole an dem Zustandekommen des Schutzeffektes zu prüfen. Dazu wurden künstlich an Substrat verarmte rote Blutzellen benutzt, die nur noch bei Zusatz von Traubenzucker eine Stoffwechselsteigerung aufwiesen, und der Hämolyseverlauf bei solchen Zellen mit und ohne Gegenwart von Traubenzucker verglichen. Es erwies sich, daß der Schutzeffekt auch ohne Traubenzuckerzusatz zustandekommt und also von der Stoffwechselwirkung der Thiole unabhängig ist. Ein Versuchsbeispiel für Dimercaptopropanol bringt die Abb. 5.

Auf der Suche nach dem Wirkungsmechanismus der Sulfhydrylkörper führte die Feststellung weiter, daß bei der Hämolyse durch ultraviolette Strahlen Photooxydationen eine Rolle spielen. Dies ging aus der

Beobachtung hervor, daß rote Blutzellen bei Bestrahlung in stickstoffgesättigter Suspension bedeutend resistenter waren als in Suspensionen, die mit dem Luftsauerstoff im Gleichgewicht standen.

Die erhöhte Resistenz der Erythrocyten in Stickstoff kann hierbei nicht auf einer Filterwirkung beruhen, da Stickstoff bekanntlich in dem hämolytisch wirksamen Bereich Licht nicht absorbiert[8]. Umgekehrt ist auch die gesteigerte Anfälligkeit der Erythrocyten bei Gegenwart von Sauerstoff nicht auf die Sauerstoffanwesenheit an sich, sondern auf die erst unter Lichteinwirkung eintretenden Oxydationen zurückzuführen. Das darf man wohl aus der Feststellung schließen, daß unbestrahlte Erythrocyten gegen die Hypotoniehämolyse bei Gegenwart von Sauerstoff sogar etwas resistenter sind[16]. -- Wichtig ist weiter die Feststellung, daß die Rolle des Sauerstoffs auch bei Bestrahlungsversuchen an Methämoglobinzellen

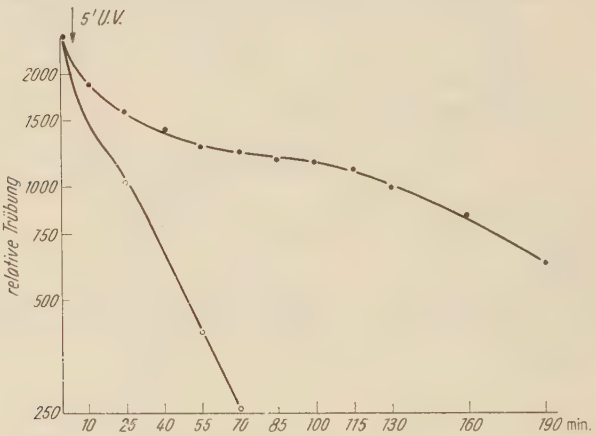


Abb. 6. UV-Hämolyse (Methämoglobinzellen): •—• in stickstoffgesättigtem Milieu, o—o bei Luftzutritt während der Bestrahlung.

hervortrat (vgl. Abb. 6). Weiter zeigten Suspensionen von normalen roten Blutzellen und von Methämoglobinzellen, die auf gleichen Trübungswert eingestellt waren und die die gleiche osmotische Resistenz aufwiesen, nach Sättigung ihres Suspensionsmilieus mit Sauerstoff unter gleichen Versuchsbedingungen auch die gleiche Strahlenempfindlichkeit. Daraus geht hervor, daß nicht der am Hämoglobin gebundene, sondern der in der Suspensionsflüssigkeit physikalisch gelöste Sauerstoff von entscheidender Bedeutung ist.

Die Versuchsergebnisse legen also die Annahme nahe, daß an dem Zustandekommen der Hämolyse durch ultraviolette Strahlen Photooxydationen beteiligt sind. Der festgestellte Schutzeffekt könnte dann wohl am einfachsten so erklärt werden, daß die Thiole auf Grund ihrer leichten Oxydierbarkeit Photooxydationen von der Erythrocytenmembran auf sich ablenken. Diese Vorstellung würde insbesondere dann annehmbar sein, wenn man die Photooxydationen nicht als Folge einer unmittelbaren Einwirkung der Strahlen auf die Erythrocytenmembran auffaßt, sondern

die Zwischenschaltung „aktivierten" Wassers annimmt. — Die Überlegenheit des Dimercaptopropanols als Schutzstoff im Vergleich zu Cystein und Glutathion müßte dann auf seine größere Oxydationsgeschwindigkeit zurückgehen.

Tatsächlich läßt sich bei entsprechenden Untersuchungen zeigen, daß in Gegenwart von glucosefreien Erythrocyten oder von Hämolysat die Sauerstoffaufnahme des Dimercaptopropanols ($7{,}5 \times 10^{-3}$ m, 80 min) gegenüber Cystein ($1{,}5 \times 10^{-2}$ m, 120 min) oder Glutathion ($1{,}5 \times 10^{-2}$ m, über 9 Std) schneller beendet ist. Doch da sich Cystein und Glutathion trotz erheblicher Differenz in ihrer Oxydationsgeschwindigkeit etwa gleichwertig als Schutzsubstanzen erwiesen, muß noch ein anderer Faktor im Spiel sein. Vielleicht ist ihre Gleichwertigkeit in dieser Beziehung durch die Tatsache erklärt, daß sie beide in Erythrocyten nicht eindringen, während Dimercaptopropanol mit Leichtigkeit permeiert[36].

Für das Verständnis der zugrundeliegenden photochemischen Reaktion ist schließlich noch eine Versuchsserie wichtig, bei welcher die Frage geprüft wurde, ob der Schutzeffekt der Thiole auch bei Abwesenheit von Sauerstoff zustandekommt. Für diese Versuche wurden vor allem Methämoglobinzellen verwandt, da sich rote Blutzellen auch bei längerer Durchströmung der Suspension mit reinem Stickstoff nur schwer vollständig vom Sauerstoff befreien lassen. Bei dem Vergleich des Hämolyseverlaufs in zwei stickstoffgesättigten Suspensionen solcher Zellen, sie sich nur durch die An- oder Abwesenheit von Cystein oder Glutathion unterschieden, zeigte sich, daß die Thiole auch unter diesen Bedingungen einen, wenn auch relativ geringen, Schutzeffekt ausüben.

Diskussion.

Die Schutzfunktion der Sulfhydrylkörper ist nicht auf die Hämolyse durch ultraviolette Strahlen beschränkt. Nach den älteren Beobachtungen von Geszner u. Köster[14] ist Glutathion ein Hemmungsfaktor gegen eine ganze Reihe von hämolytisch wirksamen Substanzen. Neuerdings hat Fegler[12] darüberhinaus wahrscheinlich machen können, daß Glutathion auch unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Strukturintegrität des Erythrocyten spielt. Während bei diesen Beobachtungen der Wirkungsmechanismus des Glutathions nicht ohne weiteres durchsichtig ist, scheint bei der Hämolyse durch ultraviolette Strahlen die Wirkung der Sulfhydrylkörper wenigstens teilweise durch eine Verhinderung von Photooxydationen an der Erythrocytenmembran erklärt zu sein.

Damit ist die Frage aufgeworfen, wie diese Photooxydationen zustandekommen. Zunächst muß an eine photodynamische Wirkung gedacht werden, weil diese bekanntlich nur in Gegenwart von Sauerstoff eintritt und ihr Wesen, wie W. Straub[11] festgestellt hat, in Oxydationsreaktionen besteht. Jedoch fehlt zu diesem Erklärungsversuch ein wichtiges Beweisstück, nämlich der Nachweis eines entsprechenden, in normalen Erythrocyten vorkommenden Photosensibilisators. Zwar findet sich in roten Blutzellen das photodynamisch wirksame Protoporphyrin, jedoch nur in 0,1% der Zellen, den sogenannten Fluorocyten (Literatur siehe [19]), und außerdem sensibilisieren die Porphyrine ganz vorwiegend für sichtbares Licht[5]. Die Tatsache, daß in Parallele zu den hier mitgeteilten Beobachtungen sich auch die photodynamisch bewirkte Hämolyse durch Reduktionsmittel verhindern läßt[5]

reicht aber nicht zu der Schlußfolgerung aus, daß in beiden Fällen der gleiche photochemische Vorgang zugrunde liegen muß. Denn Thiole können auch in einfachen Systemen, bei denen die Anwesenheit eines Photosensibilisators ausgeschlossen ist, eine Schutzwirkung ausüben. Beispielsweise vermag nach Shugar[37] Cystein die Triosephosphat-Dehydrogenase gegen die Inaktivierung durch ultraviolette Strahlen in bemerkenswertem Umfang zu schützen.

Wenn sich auch die Beteiligung einer photodynamischen Wirkung nicht ausschließen läßt, so ist doch darauf hinzuweisen, daß die mitgeteilten Beobachtungen im Zusammenhang mit neueren Vorstellungen über die Wirkung ultravioletter Strahlen auch eine andere und vielleicht befriedigendere Erklärung finden können. In den letzten Jahren ist nämlich die Möglichkeit indirekter biologischer Wirkungen des ultravioletten Lichts über „Aktivierung" des Wassers nahegelegt worden (Übersichten[1, 10, 11]). Da Wasser selbst erst unterhalb 185 mμ in nenenswertem Umfang absorbiert, kann bei Benutzung der üblichen Quecksilberdampflampe als Strahlenquelle eine solche Aktivierung nur in Gegenwart von anderen absorbierenden Molekülen zustandekommen. In diesem Falle soll es vor allem bei Anwesenheit von Sauerstoff, aber auch bei seiner Abwesenheit, zur Bildung von Radikalen und Peroxyden kommen, die stark oxydierende Eigenschaften haben. Unter Zugrundelegung dieser Vorstellung würde die Schutzwirkung der Thiole darin bestehen, durch Erniedrigung des Sauerstoffpartiardrucks die Bildung solcher oxydierenden Stoffe einzuschränken und darüber hinaus die trotzdem gebildeten, oxydierenden Stoffe vor ihrer Reaktion mit dem zu schützenden Objekt abzufangen (über die möglichen Reaktionswege siehe [3]). Dieser Deutungsversuch hat den Vorzug, auch die Beobachtung verständlich zu machen, daß die Thiole sogar bei Abwesenheit von Sauerstoff einen Schutzeffekt auszuüben vermögen.

Wenn hier auf die mögliche Rolle von indirekten Wirkungen des UV über „aktiviertes" Wasser hingewiesen wurde, dann sollte damit nicht die Bedeutung direkter Effekte auf die Erythrocytenmembran geleugnet werden. Die Beteiligung solcher direkten Wirkungen wird ja schon durch die Beobachtung nahegelegt, daß die Thiole unter allen Versuchsbedingungen die Hämolyse durch ultraviolette Strahlen niemals haben *vollständig* aufheben können.

Zusammenfassung.

Die Sulfhydrylkörper Glutathion, Cystein und Dimercaptopropanol schützen menschliche Erythrocyten vor der Lyse durch ultraviolette Strahlen. Als Ursache für diesen Effekt ist neben anderen untersuchten Möglichkeiten ein physikalischer Schutz infolge Filterwirkung der benutzten Stoffe auszuschließen. Der Schutzeffekt kommt auch nicht über eine von den Thiolen bewirkte Steigerung des oxydativen Kohlenhydratabbaus zustande, welche Energie liefern könnte für die Aufrechterhaltung der, unter Einwirkung ultravioletter Strahlen verlorengehenden, relativen Kationenimpermeabilität der roten Blutzellen. Der Wirkungsmechanismus ist vielmehr darin zu sehen, daß die Sulfhydrylkörper auf Grund ihrer leichten Oxydierbarkeit die an dem Zustandekommen der Lichthämolyse beteiligten Photooxydationen verhindern. Dieser Befund wird im Zusammenhang mit neueren Vorstellungen über die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf biologische Objekte diskutiert, welche die Beteiligung „aktivierten" Wassers nahelegen.

Literatur.

[1] Bacq, Z. M.: Experientia (Basel) **7**, 11 (1951). — [2] Barron, E. S. G., Z. B. Miller and J. Meyer: Biochemic. J. **41**, 78 (1947). — [3] Barron, E. S. G., S. Dickman, J. A. Muntz and T. P. Singer: J. Gen. Physiol. **32**, 537 (1949). — [4] Bersin, T.: Z. physiol. Chem. **222**, 177 (1933). — [5] Blum, H. F.: Photodynamic action and diseases caused by light. New York: Reinhold Publishing Corp. 1941. — [6] Bruns, F., u. W. Rummel: Biochem. Z. **321**, 197, 236 (1950). — [7] Bruns, F., W. Rummel u. A. Thielke: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 258 (1952). — [8] Dhar, N. R.: The chemical action of light. London u. Glasgow: Blackie and Son limited 1931. — [9] Duncker, E., u. H. Passow: Pflügers Arch. **252**, 542 (1950). — [10] Errera, M.: Progress in Biophysics and Biophysical chemistry **3**, 88 (1953). — [11] Errera, M., et A. Herve: Mécanismes de l'action biologique des radiations. Liège: Éditions Desoer; Paris: Masson. — [12] Fegler, G.: Nature (Lond.) **170**, 624 (1952). — [13] Flynn, F., and M. Maizels: J. of Physiol. **110**, 301 (1949). — [14] Geszner, O., u. H. Köster: Verh. dtsch. Pharmakol. Ges. **12**, 177 (1935). — [15] Harris, E. J., and M. Maizels: J. of Physiol. **113**, 506 (1951). — [16] Jacobs, M. H., and A. K. Parpart: Biol. Bull. **60**, 95 (1931). — [17] Keilin, D., and E. F. Hartree: Nature (Lond.) **157**, 210 (1946). — [18] Küsel, H.: Biochem. Z. **323**, 67 (1952). — [19] Lemberg, R., and J. W. Legge: Hematin compounds and bile pigments. New York: Interscience Publishers, Inc. 1949. — [20] Leu, J., W. Wilbrandt u. A. Liechti: Strahlenther. **71**, 487 (1942). — [21] Lieben, F., u. E. Molnar: Biochem. Z. **230**, 347 (1931). — [22] Loeschcke, H. H., u. R. Wever: Pflügers Arch. **253**, 533 (1951). — [23] Lutwak-Mann, C.: Biochemic. J. **41**, 19 (1947). — [24] Maizels, M.: J. of Physiol. **107**, 9 (1948); **112**, 59 (1951). — [25] Matthies, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 497 (1954). — [26] Meldrum, N. U.: Biochemic. J. **26**, 817 (1932). — [27] Meldrum, N. U., and H. L. A. Tarr: Biochemic. J. **29**, 108 (1935). — [28] Muralt, A., v.: Einführung in die praktische Physiologie. Berlin u. Heidelberg: Springer 1948. — [29] Ponder, E.: Hemolysis and related phenomena. New York: Grune and Stratton 1948. — [30] Ponder, E.: J. Gen. Physiol. **33**, 745 (1950). — [31] Raaflaub, J.: Helvet. physiol. Acta **11**, 142 u. 157 (1953). — [32] Raker, J. W., I. M. Taylor, J. M. Weller and A. B. Hastings: J. Gen. Physiol. **33**, 691 (1950). — [33] Repke, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 88 (1953). — [34] Repke, K., u. F. Markwardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 259 (1954). — [35] Riesser, O.: Helvet. med. Acta **9**, 720 (1942). — [36] Scheunemann, H.: Inaug. Diss., Greifswald 1951. — [37] Shugar, D.: Biochim. et Biophysica Acta **6**, 548 (1950/51). — [38] Sidwell, A. E., R. H. Munch, E. S. G. Barron and T. R. Hogness: J. of Biol. Chem. **123**, 335 (1938). — [39] Solomon, A. K.: J. Gen. Physiol. **36**, 57 (1952). — [40] Sonne, C.: Strahlenther. **25**, 559 (1927). — [41] Straub, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **51**, 383 (1904). — [42] Weiss, J., and H. Fishgold: Nature (Lond.) **137**, 71 (1936). — [43] Weller, J. M., and I. M. Taylor: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 780 (1951). — [44] Wels, P.: Pflügers Arch. **223**, 395 (1930). — [45] Whitehead, H. A.: Science (Lancaster, Pa.) **116**, 459 (1952). — [46] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **243**, 519 (1940). — [47] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **243**, 537 (1940); **250**, 303 (1948). — [48] Woodward, G. E.: Biochemic. J. **27**, 1411 (1933).

Dozent Dr. K. Repke, Greifswald, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 312—321 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Die Wirkung des sauerstoffübertragenden Ferments in Mitochondrien aus Rattenlebern bei niedrigen Sauerstoffdrucken.

Von

ALFRED BÄNDER und MANFRED KIESE.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. November 1954.)

Die Oxydation des sauerstoffübertragenden Ferments bei niedrigen Sauerstoffdrucken wurde bisher nur an Bakterien genauer untersucht. WARBURG und KUBOWITZ[18] bestimmten an Kugelbakterien (Micrococcus candidans) in Phosphatlösung mit 1% Glucose manometrisch den „Halbwertsdruck", bei dem die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme halb so groß ist wie unter Luft, für 1°, 5° und 10° C zu $< 0{,}05$, bzw. 0,1 und 0,2 mm Brodie-Lösung. ($< 3{,}8$ bzw. 7,6 und $15{,}2 \times 10^{-3}$ Torr). An Hefezellen (Torula utilis) fanden sie bei 10° C und bei einem Sauerstoffdruck von 0,41 Torr die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme zu 0,65 der unter Luft beobachteten. WINZLER[19] maß den Sauerstoffdruck und die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme in Suspensionen von Bäckerhefe in Lösung von 0,067 mol Succinat und 0,1 mol Glucose je Liter (p_H 5) mit der Quecksilber-Tropfelektrode[13]. Bei 20° C war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme unter einem Druck von 0,5 Torr Sauerstoff halb so groß wie die beobachtete maximale, bei 34,3° C unter einem Druck von 1,3 Torr Sauerstoff und bei 9,5° C unter einem Druck von etwa 0,2 Torr Sauerstoff.

ELLIOT und HENRY[4] bestimmten die Sauerstoffaufnahme der Homogenate von Rattenhirnen manometrisch. Bei der Verwendung von kleinen Mengen Homogenat in 3 ml Ansatz (Sauerstoffaufnahme 15 μl/Std) und einer Schüttelgeschwindigkeit von 120/min war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme bei 37° C unter einem Sauerstoffdruck von 4 Torr noch ebenso groß wie unter Luft. Geringere Sauerstoffdrucke wurden nicht angewandt.

An KEILIN-HARTREE-Präparaten[9] aus Herzmuskulatur hat CHANCE[2] das Verhältnis von oxydiertem zu reduziertem sauerstoffübertragendem Ferment optisch bestimmt für den stationären Zustand der Atmung unter Luft mit Succinat als Substrat. Er fand, daß unter diesen Bedingungen das sauerstoffübertragende Ferment zu 87% oxydiert ist.

Die Ergebnisse von Messungen an Bakterien können auf Zellen von Warmblütern nicht übertragen werden. Unterschiede in anderen Eigenschaften der sauerstoffübertragenden Fermente (in manchen Fällen sogar in der Struktur der Hämine[3, 1, 7]) könnten auch mit solchen der Reaktion mit Sauerstoff vereinigt sein. Außerdem ist der Halbwertsdruck nicht eine lediglich von Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration und dergleichen abhängige Konstante des sauerstoffübertragenden Ferments.

sondern er ist auch von der Geschwindigkeit der Reduktion des oxydierten Ferments abhängig, d. h. von Konzentration und Wirkung anderer Cytochrome und wasserstoffübertragender Fermente.

Wir haben die Sauerstoffaufnahme von Mitochondrien aus Rattenlebern bei niedrigen Sauerstoffdrucken gemessen. In den Mitochondrien sind sauerstoffübertragendes Ferment und Cytochrome, sowie wasserstoffübertragende Fermente in der physiologischen Anordnung und Menge miteinander verbunden. Die Diffusion des Sauerstoffs durch das Zellplasma ist bei der Verwendung der Mitochondrien ausgeschlossen. Die Geschwindigkeit der Reduktion des sauerstoffübertragenden Ferments wurde in unseren Versuchen insoweit definiert und standardisiert als die maximale durch die ebenfalls in den Mitochondrien verankerte Succinatdehydrogenase erreichbare Reduktionsgeschwindigkeit angewandt wurde. Durch Zusatz von Serumproteinen wurde die Aktivität der Mitochondrien stabilisiert. Die dadurch erreichte Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme (Q_{O_2} = 100 bis 200 μl O_2/mg Protein/Std bei 37° C) dürfte den Verhältnissen in der Leberzelle annähernd entsprechen.

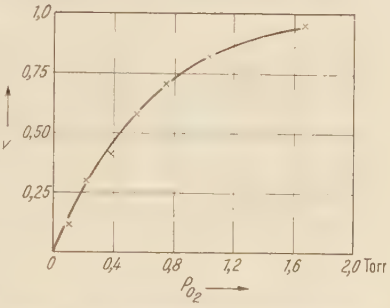


Abb. 1. Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme von Mitochondrien aus Rattenlebern bei niedrigen Sauerstoffdrucken. Substrat Succinat. Temp. 20° C. Rotationsgeschwindigkeit 1100/min. Ordinate: $v = \frac{d\,p_{O_2}}{dt}$; unter Luft v = 1,0.

Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme der Mitochondrien bei 20° C als Funktion des Sauerstoffdruckes ist in Abb. 1 dargestellt. Bei einem Sauerstoffdruck von 0,45 Torr war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme halb so groß wie unter Luft. Bei 37° C betrug der entsprechende Druck 1 Torr. Ein „kritischer Sauerstoffdruck", bei dem die Geschwindigkeit wenig geringer als die maximale ist, kann wegen des Fehlers der Messungen nur weniger genau angegeben werden. Er ist bei 20° C zu etwa 3 Torr anzunehmen.

Die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme vom Sauerstoffdruck wird von der Geschwindigkeit der Oxydation und der Geschwindigkeit der Reduktion des sauerstoffübertragenden Ferments bestimmt. Man kann annehmen

$$\frac{d\,[Fe^{+++}]}{dt} = K_O \cdot [Fe^{++}] \cdot p_{O_2} \text{ und} \tag{1a}$$

$$-\frac{d\,[Fe^{+++}]}{dt} = K_r \cdot [Fe^{+++}]\,. \tag{1b}$$

Im stationären Zustand ist dann

$$\frac{[Fe^{++}] \cdot p_{O_2}}{[Fe^{+++}]} = \frac{K_r}{K_O}\,. \tag{2}$$

Die Beziehung von $\frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]}$ zu den beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten ergibt sich aus

$$[Fe^{+++}] = [Fe^{+++} + Fe^{++}] \cdot \frac{v}{v_{max}} \tag{3a}$$

$$[Fe^{++}] = [Fe^{+++} + Fe^{++}] \cdot \left(1 - \frac{v}{v_{max}}\right) \tag{3b}$$

$$\frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]} = \frac{(v_{max} - v)}{v} \cdot \tag{3c}$$

$[Fe^{++}]$ und $[Fe^{+++}]$ sind die Konzentrationen des reduzierten bzw. oxydierten sauerstoffübertragenden Ferments, K_o und K_r die Geschwindig-

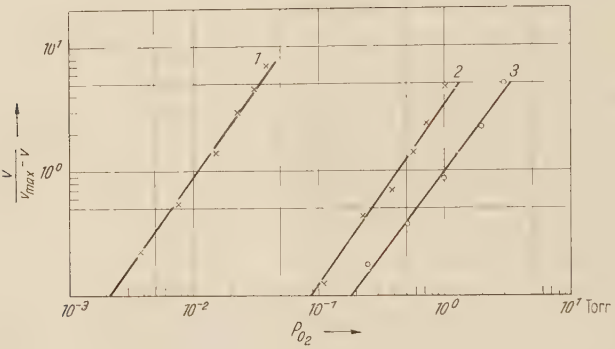


Abb. 2. Darstellung der Abhängigkeit des $\log \frac{v}{v_{max} - v}$ vom $\log p_{O_2}$. v = Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme beim Sauerstoffdruck p_{O_2}, v_{max} = Geschwindigkeit unter Luft. Gerade 1: Micrococcus candidans bei 10° C (Warburg und Kubowitz[18]). Gerade 2: Mitochondrien aus Rattenlebern bei 20° C. Gerade 3: Hefezellen bei 34,3° C (Winzler[19]). Die Marken der Geraden 2 sind Mittel aus 5 Versuchsreihen. Die Marken der Geraden 1 und 3 sind Ausgleichskurven entnommen.

keitskonstanten der Oxydation bzw. Reduktion des sauerstoffübertragenden Ferments, v und v_{max} die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme beim Sauerstoffdruck p_{O_2} bzw. unter Luft.

Weder unsere Daten, noch die Warburgs für Mikrokokken bei 10° oder die Winzlers für Bäckerhefe bei 34,3° C entsprechen der Gleichung (2). In Abb. 2 ist $\log \frac{v}{v_{max} - v}$ gegen $\log p_{O_2}$ aufgetragen[11]. Die Daten aller 3 Untersuchungsreihen folgen im Bereich von 10 bis 90% der maximalen Geschwindigkeit Geraden, welche die gleiche Neigung 1,4 haben. Die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme vom Sauerstoffdruck wird also für den genannten Bereich in guter Annäherung durch

$$\frac{[Fe^{++}] \cdot p_{O_2}^{1,4}}{[Fe^{+++}]} = \frac{K_r}{K_o} \tag{4}$$

beschrieben.

Das Auftreten des Sauerstoffsdrucks als $p_{O_2}^{1,4}$ in Gleichung (4) kann verschiedene Ursachen haben:

1. Die in ihrem Mechanismus noch unbekannte Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und dem reduzierten Ferment folgt $[Fe^{++}] \cdot p_{O_2}^{1,4}$; 2. das sauerstoffübertragende Ferment enthält mehrere Hämine in einer Einheit; durch partielle Oxydation wird $\frac{K_r}{K_o}$ vermindert (analog der Reaktion zwischen Hämoglobin und Sauerstoff); 3. die Annahme $-\frac{d[Fe^{+++}]}{dt} = K_r \cdot [Fe^{+++}]$ ist nicht zutreffend. Am wahrscheinlichsten ist 3.

Fe^{+++} zerfällt nicht in einer monomolekularen Reaktion zu Fe^{++}, sondern es wird durch ein anderes Ferment zu Fe^{++} reduziert. Korrekt ist

$$(5) \qquad -\frac{d[Fe^{+++}]}{dt} = K_r \cdot [Fe^{+++}] \cdot [E_r].$$

$[E_r]$, die Konzentration der reduzierten Form des Ferments, das Fe^{++} reduziert, könnte auch bei vollständiger Sättigung der Succinatdehydrogenase mit Substrat nur dann unabhängig vom Sauerstoffdruck sein, wenn die Reaktion $Fe^{+++} + E_r \rightarrow Fe^{++} + E_o$ langsam verliefe gegenüber den vorgelagerten Reaktionen, welche E_o zu E_r reduzieren.

Durch Ersatz von Gleichung (1b) durch Gleichung (5) ergibt sich eine Änderung von $[E_r]$ proportional $p_{O_2}^{0,4}$.

Alle Beobachtungen über den Zustand der Cytochrome, die dem E der Gleichung (5) entsprechen, in Zellen und Zellpartikeln stimmen darin überein, daß sie bei stationärer Atmung zu einem großen Teil in oxydierter Form vorhanden sind, wenn $[Fe^{+++}]$ gegenüber $[Fe^{++}]$ groß ist, und nur dann überwiegend in reduzierter Form, wenn $[Fe^{+++}]$ klein ist gegenüber $[Fe^{++}]$. Daher erscheint nach Gleichung (4) $\frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]}$ nicht proportional $\frac{1}{p_{O_2}}$ sondern proportional $\frac{1}{p_{O_2}^{1,4}}$.

Aus den beobachteten Halbwertsdrucken von 0,45 Torr bei 20° und 1 Torr bei 37° C ergibt sich nach (4) $\frac{K_r}{K_o}$ zu 0,33 Torr bei 20° C und zu 1 Torr bei 37° C. Unter dem Sauerstoffdruck der Luft bei 20° C ist dann $\frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]}$ ungefähr 10^{-3}.

Im Zentralnervensystem treten Funktionsstörungen (Bewußtseinsverlust) ein, wenn der venöse Sauerstoffdruck auf 19 Torr absinkt. Aus Capillarisierung, Sauerstoffverbrauch und der Diffusion des Sauerstoffs haben Opitz u. Schneider[12] errechnet, daß der intracelluläre Sauerstoffdruck dann etwa 13 Torr beträgt. Bei 13 Torr und 37° C ist $\frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]}$ 0,03, d. h. die Atmung ist um 3% vermindert.

Schneider u. Mitarb.[17] haben den Sauerstoffverbrauch des Gehirns im isoliert durchströmten Kopf bei venösem Sauerstoffdruck von 19 Torr gemessen und eine Verminderung der Sauerstoffaufnahme um 3% gegenüber der bei höheren Sauerstoffdrucken gefunden.

Als letale Schwelle wurde ein venöser Sauerstoffdruck im Gehirn von 12 Torr berechnet, dem entspräche ein Sauerstoffdruck von etwa 6 Torr in den Zellen. Das Verhältnis $\frac{[Fe^{++}]}{[Fe^{+++}]}$ wäre dann 0,08. Das Gehirn kann demnach eine Verminderung seiner Atmung durch Sauerstoffmangel um 10% nicht ertragen.

Die kritischen venösen Sauerstoffdrucke des Gehirns haben eine nur geringe Streuung[12]. Das ist aus der Kinetik des sauerstoffübertragenden Ferments verständlich. Entsprechend der Abhängigkeit des Quotienten $\frac{v_{max}-v}{v}$ von $p_{O_2}^{1,4}$ ändert sich die Atmung der Zellen bei niedrigen Sauerstoffdrucken sehr stark mit Änderung des Sauerstoffdrucks. Die kritischen Bereiche der Atmungsgrößen werden bei abfallendem Sauerstoffdruck schnell durchschritten.

Daten des Halbwertsdruckes bzw. der „Gleichgewichtskonstanten" bei verschiedenen Temperaturen sind oben schon genannt. Wir haben außerdem die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme des Cytochrom-Succinatdehydrogenase-Systems unter voller Sättigung mit Sauerstoff und Succinat bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Die Aktivierungsenergie für das ganze System nach der Arrhenius-Gleichung berechnet betrug $A = 17000$ cal. Aus den Konstanten für das „Gleichgewicht" zwischen sauerstoffübertragendem Ferment und Sauerstoff bei 20° und 37° C ergab sich die Grundreaktionswärme zu 12500 cal.

Methoden.

Mitochondrien wurden aus Lebern männlicher Ratten von 150—300 g Gewicht nach dem Prinzip von Schneider[6, 15, 16], Lehninger und Kennedy[10] dargestellt. Die Ratten wurden durch Nackenschlag getötet. Zur Entblutung wurde der Kopf sofort abgetrennt. Die zerkleinerten und in Eis gekühlten Lebern wurden mit dem 10fachen Volumen 0,88 mol Rohrzuckerlösung unter Eiskühlung 45 sec lang mit 15000 Umdrehungen/min homogeniert. Das Homogenat wurde 5 min lang bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Niederschlag, der Zellreste, Kerne und Erythrocyten enthielt, abgetrennt, abermals 5 min bei 1500 g zentrifugiert und wiederum vom Niederschlag abgetrennt. Die Zentrifugierung des Überstandes wurde noch dreimal wiederholt Bei der Abtrennung des Überstandes wurden jetzt die großen Mitochondrien, die als lose Schicht über dem festen Niederschlag lagen, durch vorsichtiges Aufwirbeln in den Überstand wieder aufgenommen. An der Gewinnung der großen Mitochondrien waren wir besonders interessiert, da sie eine stärkere O_2-Aufnahme zeigen als die kleineren. Aus dem zuletzt erhaltenen Überstand wurden die Mitochondrien durch Zentrifugieren (35 min, 2000 g) abgetrennt und zweimal in einer etwa dem 10fachen Lebergewicht entsprechenden Menge 0,15 mol Kaliumchloridlösung auf der Zentrifuge gewaschen. Für die Versuche wurden die Mitochondrien in einer dem ursprünglichen Lebergewicht gleichen Menge 0,15 mol Kaliumchloridlösung suspendiert und bei 0° C aufbewahrt. Die Präparate wurden mikroskopisch geprüft. Für die ausgewerteten Versuche wurden Präparate mit einem Q_{O_2} von 100—200 μl O_2/mg Protein/Std verwandt.

Die Reduktion der Cytochrome wurde durch Succinatdehydrogenase bewirkt. Um das sauerstoffübertragende Ferment möglichst stark zu belasten, wurden

Bedingungen für maximale Sauerstoffaufnahme gewählt. Im Versuchsansatz wurden 0,25 ml Mitochondriensuspensionen mit 0,5 ml 0,05 mol Phosphatlösung p_H 7,4, 0,25 ml 0,025 mol Magnesiumsulfatlösung, 0,5 ml $3{,}5 \times 10^{-4}$ mol Cytochrom c-Lösung, 0,25 ml 5% Serumproteinlösung und 0,25 ml 0,64 mol Natriumsuccinatlösung versetzt. Die Mitochondrienmenge wurde so gewählt, daß die Ansätze in 5 min 2 –5 μl Sauerstoff aufnahmen. Wurden dafür kleinere Mitochondrienmengen benötigt, so wurde die Differenz durch 0,15 mol Kaliumchloridlösung ergänzt.

Der Zusatz von Protein stabilisierte die Mitochondrien bei der Verdünnung und besonders gegen die Einwirkung der hohen Rotationsgeschwindigkeit der Reaktionsgefäße. Als Protein wurde gefriergetrocknetes Hundeserum verwendet.

Die Sauerstoffaufnahme wurde manometrisch bestimmt. Um die Sauerstoffdiffusion bei niedrigen Sauerstoffdrucken als begrenzend auszuschalten, wurde neben einer geringen Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme eine starke Bewegung des Reaktionsansatzes angewandt. Da durch starkes Schütteln die Mitochondrien schnell unwirksam und die Messungen durch Schaumbildung gestört werden, wurden die Ansätze in zylindrischen Reaktionsgefäßen von 17—19 ml Inhalt mit hoher Geschwindigkeit rotiert. Dabei bildete sich ein schnell bewegter nicht schäumender Flüssigkeitsfilm an der Zylinderwand aus. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug maximal 1100 Umdrehungen je Minute. Bei den hohen Rotationsgeschwindigkeiten wurde die Succinatlösung aus dem flachen Seitenansatz der Gefäße in den Hauptraum gespült, so daß ein Einkippen zu Versuchsbeginn nicht erforderlich war. Das Thermobarometer wurde zusammen mit dem Reaktionsgefäß rotiert.

Gasgemische wurden in Stahlzylindern hergestellt. Ihr Gehalt an Sauerstoff wurde in Gemischen mit mehr als 2% Sauerstoff nach Haldane[14] bestimmt. Geringere Sauerstoffgehalte wurden manometrisch gemessen. In Warburg-Gefäße wurden größere Mengen von Mitochondrien gegeben, die Gefäße mit dem betreffenden Gasgemisch gefüllt und die Druckabnahmen nach Zugabe von Succinat bis zur Druckkonstanz bestimmt. Kohlenoxyd wurde manometrisch im van Slyke-Apparat mit Winklers Kupfer-I-chlorid bestimmt[14].

Cytochrom c wurde nach Keilin und Hartree[16] aus Pferdeherzen dargestellt und bis zu einem Eisengehalt von 0,43% gereinigt.

Proteinbestimmungen wurden mit der Biuret-Methode von Gornat, Badavick und David[5] durchgeführt.

Ergebnisse.

1. Stabilisierung der Mitochondrien durch Proteine.

Da die Wirksamkeit der Mitochondrien und die Zusammensetzung der Stammsuspensionen nicht immer gleich waren, mußte mit jedem Mitochondrienpräparat die für die erforderliche geringe Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme geeignete Menge von Mitochondrien ermittelt werden. Dabei wurde beobachtet, daß beim Verdünnen der Mitochondriensuspension die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme nicht der Mitochondrienkonzentration proportional abnahm. Für alle Präparate ergab sich ein größeres Q_{O_2}, wenn große Mengen Mitochondrien im Versuchsansatz verwandt wurden.

Durch das schnelle Fließen der Flüssigkeit der Versuchsansätze an der Gefäßwand wurden die Fermentwirkungen der Mitochondrien innerhalb kurzer Zeit stark vermindert. Ansätze von 10 verschiedenen Mitochondrienpräparaten, welche unter Luft in 5 min 3 bis 5 μl Sauerstoff aufnahmen, wurden durch 5 min langes Rotieren (800 Umdrehungen je Minute) bei 20° C in ihrer Wirkung um 18 – 50% vermindert. Bei 37° C war die Wirkung des schnellen Rotierens noch stärker, so wurde z. B. die Wirkung eines Mitochondrienpräparates durch 20 min langes Rotieren mit 660 Umdrehungen/min auf ein Zehntel vermindert.

Durch Zusatz von Serumproteinen zu den Versuchsansätzen wurde die Wirksamkeit der Mitochondrien gesteigert, die Sauerstoffaufnahme der Ansätze wurde der Mitochondrienmenge proportional, und die Mitochondrien wurden weitgehend gegen die Wirkung der schnellen Rotation geschützt.

Die Steigerung der Wirksamkeit der Mitochondrien durch Proteine war bei den einzelnen Präparaten verschieden und war um so größer, je stärker die Verdünnung der Mitochondrien im Versuchsansatz war. In der Abb. 3 ist die Wirkung verschiedener Proteinkonzentrationen auf 5 verschiedene Mitochondrienpräparate, von denen 0,6—1,0 mg Mitochondrien-Protein je Ansatz verwandt wurden, dargestellt. Sie veranschaulicht einerseits den ungleichen Grad der Wirksamkeitssteigerung der Mitochondrienpräparate und andererseits deren Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Durch einen Gehalt von 0,5% Protein wurde die höchste Wirksamkeit der Mitochondrien erreicht. Während eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration die Wirksamkeit nicht mehr beeinflußte, wurde bei manchen Präparaten die Sauerstoffaufnahme durch zusätzliche Einwirkung von Äthylendiamintetraessigsäure noch gesteigert.

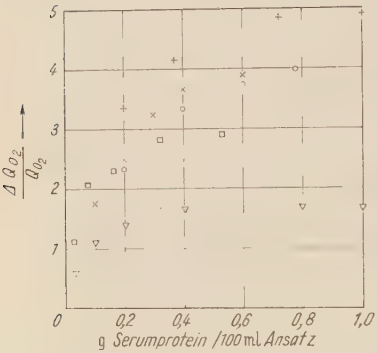


Abb. 3. Steigerung der Sauerstoffaufnahme von Mitochondrien aus Rattenlebern durch Zusatz von Serumproteinen bei voller Sättigung mit Succinat, unter Luft, Temperatur 37° C. Q_{O_2} = Sauerstoffaufnahme ohne Proteinzusatz. ΔQ_{O_2} = Sauerstoffaufnahme mit Proteinzusatz minus Q_{O_2}.

Die Stabilisierung der Mitochondrien gegen die Wirkung der schnellen Rotation der Versuchsansätze durch maximal aktivierende Proteinkonzentrationen war bei 20° C sehr gut wirksam. Durch 100—150 min langes Rotieren mit einer Geschwindigkeit von etwa 1000 Umdrehungen pro Minute wurde die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme im Mittel nur um 15% vermindert. Bei 37° C wurden die Mitochondrien durch Proteine nicht gleich gut stabilisiert. Für jedes Mitochondrienpräparat wurde die Inaktivierung durch das Rotieren unter Luft bestimmt zur Korrektur der Messungen unter niedrigen Sauerstoffdrucken.

2. Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme bei niedrigen Sauerstoffdrucken.

Die meisten Versuche zur Bestimmung des kritischen Sauerstoffdrucks, d. h. des Sauerstoffdrucks, der zu maximaler Wirkung des sauerstoffübertragenden Ferments gerade ausreicht, sowie zur Bestimmung des Halbwertsdrucks wurden bei 20° C durchgeführt. Bevor die Stabilisierung der Mitochondrien durch Proteinzusatz angewandt wurde, mußte wegen der fortschreitenden Wirkungsabnahme der Mitochondrien während des Versuches jeweils die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme unter Luft und unter einem bestimmten niedrigen Sauerstoffdruck in den ersten Minuten des Versuches verglichen werden. So wurde festgestellt, daß die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme (3 bis 7 μl O_2 je 10 min) bis zu einem Sauerstoffdruck von 2,3 Torr nicht mehr als 5% von der unter Luft abwich. Unter einem Sauerstoffdruck von

1 Torr betrug die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme im Mittel 0,75 der unter Luft. In Tab. 1 ist eine Reihe solcher Messungsergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 1. *Sauerstoffaufnahme von Mitochondrien unter niedrigen Sauerstoffdrucken bei verschiedenen Temperaturen.*
v_{max} = O_2-Aufnahme unter Luft (3 bis 6 μl/10 min) v = O_2-Aufnahme bei dem betreffenden Sauerstoffdruck.

Temperatur ° C	Sauerstoffdruck Torr	Zahl der Messungen	$\frac{v}{v_{max}}$
37	22	14	1,0
	8,2	25	0,95
	5,4	21	0,92
	2,3	9	0,75
	1,0	26	0,5
20	5,4	5	1,0
	2,3	6	0,98
	1,0	42	0,76
0	1,0	4	1,0

Die Stabilisierung der Mitochondrien durch Proteinzusatz ermöglichte die Auswertung der späteren Phasen des Versuchsablaufs und damit eine genauere Ermittlung des Halbwertsdruckes.

In Abb. 1 sind die Mittelwerte der Daten aus 5 Versuchen enthalten. Unter Luft betrug die Sauerstoffaufnahme 2 bis 5 μl O_2 je 10 min; sie wurde zur Vereinheitlichung der Ergebnisse gleich 1 gesetzt. Die mittlere Streuung der eingetragenen Mittel beträgt 8%. Halb so groß wie unter Luft war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme bei 0,45 $\pm$ 0,035 Torr Sauerstoff. Die Sauerstoffkonzentration im Wasser beträgt bei diesem Druck 4,2 $\times$ 10^{-7} mol $\times$ l^{-1}. Der „kritische Sauerstoffdruck" war durch diese Versuche nicht mit gleicher Genauigkeit zu ermitteln, er ist bei ungefähr 3 Torr anzunehmen.

Bei der Temperatur von 37° C betrug die Sauerstoffaufnahme der Mitochondrien bei einem Sauerstoffdruck von 2,3 Torr 0,75 der unter Luft. Unter einem Sauerstoffdruck von 1 Torr und Reaktionsgeschwindigkeiten von 3 bis 6 μl O_2/10 min war die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme 0,5 der unter Luft (Tabelle 1). Messungen der Sauerstoffaufnahme über längere Zeit mit stabilisierten Mitochondrien unter einen anfänglichen Sauerstoffdruck von 2 bis 4 Torr ergaben einen Halbwertsdruck von 1,0 Torr.

Die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem Sauerstoffdruck konnte bei 37° C nicht mit gleicher Genauigkeit bestimmt werden wie bei 20° C, weil die Stabilisierung der Mitochondrien bei dieser Temperatur nicht ebenso wirksam ist und größere Korrekturen für die Inaktivierung ungenau sind.

3. Der Temperaturkoeffizient des Cytochrom-Succinatdehydrogenase-Systems.

Die Sauerstoffaufnahme der Lebermitochondrien bei verschiedenen Temperaturen wurde unter Luft gemessen. Die Rotationsgeschwindigkeit der Versuchsansätze wurde immer so gewählt, daß die Geschwindigkeit der Oxydation des sauerstoffübertragenden Ferments maximal war. Die auch in allen anderen Versuchen angewandten Konzentrationen von Cytochrom c und Succinat waren sowohl bei 0° C als auch bei 37° C von maximaler Wirkung.

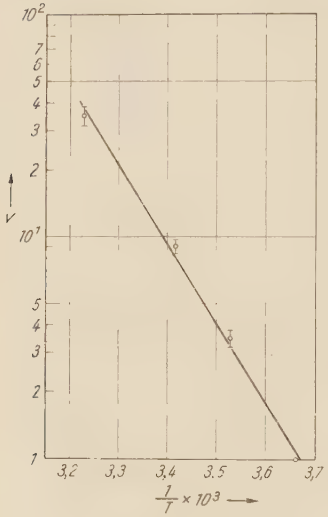


Abb. 4. Abhängigkeit der Wirkung des Cytochrom-Succinatdehydrogenase-Systems in Mitochondrien aus Rattenlebern von der Temperatur. Gasraum Luft. T = absolute Temperatur. v, die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme ist für alle Versuchsreihen bei 0° C gleich 1 gesetzt. Die Marken sind die Mittel aus 8 Versuchsreihen; die vertikalen Geraden geben die Streuung der Mittel an.

Der Einfluß der Temperatur wurde teils dadurch ermittelt, daß die Sauerstoffaufnahme der gleichen Menge eines Präparates bei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde, teils dadurch, daß bei den verschiedenen Temperaturen solche Mitochondrienmengen verwandt wurden, die eine jeweils annähernd gleiche Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme bewirkten. Die Ergebnisse stimmten innerhalb der Messfehler überein.

In der Abb. 4 sind die Ergebnisse von 8 Versuchsreihen zusammengestellt. Die Geschwindigkeit bei 0° C wurde für alle Versuche als Einheit gewählt und die Geschwindigkeit bei höheren Temperaturen in dieser Einheit berechnet. Der Logarithmus der Geschwindigkeit bei den untersuchten Temperaturen ist $\frac{1}{T}$ nicht ganz proportional, jedoch weichen die Mittel nur um den Betrag ihrer Streuung, die weniger als 10% beträgt, von einer Geraden ab. Die Aktivierungsenergie für die Sauerstoffaufnahme der Mitochondrien wurde nach der Arrhenius-Gleichung $\log v \quad H - \frac{A}{2\,RT}$ aus der Neigung der Geraden $\log v$ gegen $\frac{1}{T}$ zu 17000 cal berechnet.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Zusammenfassung.

An Mitochondrien aus Rattenlebern wurde die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme bei niedrigen Sauerstoffdrucken gemessen.

Für Reaktionsgeschwindigkeiten, welche denen der Zelle ungefähr entsprechen, betrug der Halbwertsdruck des Sauerstoffs (das ist der Sauerstoffdruck, bei dem die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme halb so groß ist wie unter Luft) bei 20° C 0,45 Torr und bei 37° C 1 Torr. Die Beziehung der ermittelten Daten über die Kinetik des sauerstoffübertragenden Ferments zum „kritischen Sauerstoffdruck" in der Zelle wurde erörtert.

Die Aktivierungsenergie des Cytochrom-Succinatdehydrogenase-Systems wurde zu 17000 cal gefunden.

Literatur.

[1] Barret, J., and R. Lemberg: Nature (Lond.) **173**, 213 (1954). — [2] Chance, B.: Nature (Lond.) **169**, 215 (1952). — [3] Chance, B., L. Smith and L. Castor: Biochim. et Biophysica Acta **12**, 289 (1953). — [4] Elliot, K. A. C., and M. Henry: J. of Biol. Chem. **163**, 351 (1946). — [5] Gornatt, A. G., C. J. Badawick and M. M. David: J. of Biol. Chem. **177**, 751 (1948). — [6] Hogeboom, G. H., W. C. Schneider and G. S. Palade: J. of Biol. Chem. **172**, 619 (1948). — [7] Jensen, J., u. E. Thofern: Z. Naturforsch. **96**, 596 (1954). — [8] Keilin, D., and E. F. Hartree: Biochemic. J. **39**, 289 (1945). — [9] Keilin, D., and E. F. Hartree: Biochemic. J. **41**, 503 (1947). — [10] Lehninger, A. L., and E. P. Kennedy: J. of Biol. Chem. **173**, 753 (1948); **179**, 957 (1949). — [11] Lineweaver, H., and D. Burk: J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934). – [12] Opitz, E., u. M. Schneider: Erg. Physiol. **46**, 126 (1950). — [13] Petering, H. G., and F. Daniels: J. Amer. Chem. Soc. **60**, 2796 (1938). — [14] Peters, J. P., and D. D. van Slyke: Quantitative clinical Chemistry II. Baltimore 1931. — [15] Schneider, W. C.: J. of Biol. Chem. **176**, 259 (1948). — [16] Schneider, W. C., and G. H. Hogeboom: Cancer Res. **11**, 1 (1951). — [17] Schneider, M. u. Mitarb.: Pflügers Arch. im Druck. — [18] Warburg, O., u. F. Kubowitz: Biochem. Z. **214**, 5 (1929). — [19] Winzler, R. J.: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **17**, 263 (1941).

Prof. Dr. M. Kiese, Marburg/Lahn, Pharmakol. Inst. der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 322—326 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen).

Der Wirkungsmechanismus des meso-Inosit als lipotrope Substanz bei der Bestschen Mangelkostratte.

Von
Fritz Hartmann und Hans-Joachim Gerth.

(Eingegangen am 22. Oktober 1954.)

Die „lipotrope" Wirkung des Inosits wurde von Gavin und McHenry bei Ratten entdeckt, die angeblich durch Fütterung von Biotin, Thiamin, Riboflavin, Panthothensäure und Pyridoxin eine Leberverfettung bekamen. Die „Biotin-Fettleber" beruht aber wahrscheinlich auf anderen diätetischen Ursachen als auf der Zufuhr der genannten Vitamine des B-Komplexes. Mit einer Kost, die calorisch vollwertig war, alle notwendigen Vitamine und Salze, jedoch kein Fett und keine der bekannten lipotropen Substanzen Methionin, Cholin, Betain enthielt, konnten Best u. Mitarb. bei Ratten eine Leberverfettung erzeugen, die sich durch Inosit zum Teil verhindern ließ. Inosit war jedoch nicht wie die übrigen lipotropen Stoffe in der Lage, einen normalen Gesamtfett- und Cholesterinestergehalt wieder herzustellen und erwies sich bei einer fetthaltigen Diät als völlig wirkungslos. Cholin- und Inositwirkung addieren sich bis zu einem gewissen Grade.

Auch beim Menschen wurde eine den Lipoidgehalt verfetteter Lebern herabsetzende Wirkung des Inosits beschrieben (Abels, Kupel, Pack und Rhoads; Ariel, Abels, Murphy, Pack und Rhoads; Echaurren und Jorquera; Gerhardt; Broun). McHenry und Patterson hielten sogar die Wirkung des Lipocaic eigentlich für eine Inositwirkung, da Pankreasextrakte, die ja die Leberverfettung nach Pankreatektomie verhindern können, sehr inosithaltig sind.

Da Best und seine Mitarb. nur den Gesamtfettgehalt und die Cholesterinester der Rattenleber untersuchten, konnten sie über den vermutlichen Mechanisnus der Wirkung des Inosits nichts aussagen.

An der tetrachlorkohlenstoffvergifteten Ratte konnten Hartmann, Hertel, Wellmer und Schulze nachweisen, daß Inosit, wie die übrigen bisher bekannten lipotropen Substanzen den Neutralfettgehalt senkt und die Phosphatidsynthese steigert, also die Umwandlung von Neutralfetten in die Phosphatide fördert. Hartmann, Ruwe und Schulze konnten am tetrachlorkohlenstoffvergifteten Hund bei gleichzeitiger Lipoidanalyse in Leber und Blut, sowie Messung der Einbaugeschwindigkeit von P^{32} in die Leber- und Blutlipoide diese Intensivierung der Phosphatidsynthese durch Inosit bestätigen. Dabei blieb zunächst unklar, ob es zur Bildung von Inositphosphatiden oder nur zur Anregung der Synthese der üblichen vorwiegend cholinhaltigen Phosphatide kommt. Neuere Untersuchungen haben

gezeigt, daß Inosit den Eiweißkatabolismus fördert und möglicherweise nicht direkt, sondern über die Freisetzung von Methionin aus Körpereiweiß lipotrop wirkt (HARTMANN).

Die folgenden Untersuchungen wurden als Ergänzung der Befunde von BEST mit dem Ziel durchgeführt, durch Bestimmung der einzelnen Leberfettfraktionen und der Einbaugeschwindigkeit von P^{32} in die Phosphatide der Leber einen Einblick in den Wirkungsmechanismus des Inosits zu bekommen.

Methodik.

Die Versuche wurden an 106 männlichen weißen Ratten von 100—120 g Gewicht durchgeführt. 40 Tiere, in 4 Gruppen eingeteilt, dienten als normale Kontrolle. Von den übrigen erhielten 30 die von BEST u. Mitarb. angegebene Mangeldiät. Von den anderen bekamen je 18 Tiere 5 bzw. 10 mg Inosit pro 10 g Mangelkost. Nach 15 Tagen wurden die Ratten getötet. Die Lipoidanalyse in der Leber wurde, wie früher beschrieben, durchgeführt (HARTMANN, HERTEL, SCHULZE und WELLMER). Zur Bestimmung der Einbaugeschwindigkeit von P^{32} wurden den Tieren 16 Std vor der Tötung 0,02 Millicurie/100 g Körpergewicht P^{32} als $H_3P^{32}O_4$ subcutan injiziert. Zur Messung der Radioaktivität der Leberlipoide wurde ein Teil der nach MILLNER extrahierten Gesamtfettstoffe in Petroläther:benzol 14 : 1 aufgenommen. Die Lösung wurde in vorgewogene Glasschälchen von etwa 2 cm $\varnothing$ und $1^1/_2$ cm Höhe mit flachen Boden gegeben und eingedampft. An den Seitenwänden des Schälchens haftendes Fett wurde sorgfältig mit Filtrierpapier entfernt, so daß nur noch der Boden mit Fett bedeckt war. Nochmaliges Wiegen der Schälchen. Die Konzentration der Lösung wurde immer so gewählt, daß etwa 50 mg Gesamtlipoide zur Aktivitätsbestimmung kamen. Diese wurde im FRIESECKE-HOEPFNER-Gerät bei einer Zählrohrspannung von 1000 Volt gemessen. Die Zahl der gemessenen Impulse wurde auf 1 min und 1 mg Gesamtfettstoffe umgerechnet bzw. auf den Phosphatidanteil bezogen. Die statistische Auswertung wurde nach den Angaben von PÄTAU durchgeführt: $P = 0{,}01 - 0{,}0027$ = gesichert; $P = 0{,}0027$ oder weniger = gut gesichert; $P = 0{,}01 - 0{,}05$ = statistisch nicht ausreichend gesichert.

Ergebnisse.

Die ausgewerteten 106 Tiere nahmen während der Versuchskost nicht mehr als 10% an Gewicht ab. Die Gewichtsabnahme war um so häufiger und stärker, je mehr Inosit sie bekamen. 44 Tiere mit Gewichtsabnahme von mehr als 10% wurden ausgesondert. Die Todesquote lag bei Insittieren erheblich höher als bei den einfachen Mangelkosttieren. Die Insittiere waren lebhafter und freßlustiger als die übrigen. Bei dem Versuch, einer Gruppe von 20 Tieren eine calorisch unzureichende Kost (4 g pro Tag) zu geben, nahmen die Insittiere alle mehr als 30% ab, 18 starben. Bei 10 Vergleichstieren ohne Inosit starben nur 4; ihre Gewichtsabnahme betrug nur 10—20%.

Die Lebern zeigen unter der Mangelkost zunächst den von BEST u. Mitarb. beschriebenen Anstieg des Gesamtfettes ($P < 0{,}001$), während wir die Erhöhung der Cholesterinester vermißten. Die Analyse der Unterfraktionen ergibt, daß der Anstieg vorwiegend die Neutralfette

betrifft (P = 0,0025). Die Phosphatide sinken signifikant ab (P = 0,009). Die übrigen Fraktionen zeigen keine statistisch nachweisbaren Abweichungen.

Tabelle 1.

	Zahl der Tiere	Gesamtlipoide in % Trockensubstanz	Neutralfette in % Ges. Lip.	Phosphatide in % Ges. Lip.	Freies Cholesterin in % Ges. Lip.	Cholest. Ester in % Ges. Lip.	Kohlenwasserstoff und Wachse in % Ges. Lip.
Normal . .	40	17,5	27,0	46,5	3,6	5,5	5,3
		∓ 1,28	∓ 2,13	∓ 1,93	∓ 1,07	∓ 0,92	
Mangelkost	30	29,1	40,6	35,8	4,1	3,4	2,2
		∓ 0,99	∓ 0,74	∓ 1,66	∓ 0,95	∓ 0,82	
Mangelkost + Inosit	36	22,8	26,9	36,7	5,9	7,3	4,2
		∓ 0,93	∓ 1,6	∓ 1,51	∓ 0,69	∓ 0,96	

Unter Inosit sinken die Gesamtlipoide und Neutralfette ab (P = 0,002 bzw. 0,001). Die Gesamtfette werden aber nicht auf den Normalwert reduziert (P = 0,018). Das Gleiche gilt für die Neutralfette (P größer 0,1). Ein Anstieg der Phosphatide unter der Insitwirkung ist statistisch nicht gesichert (P größer als 0,1). Vielmehr bleiben die Phosphatide erheblich unter dem Normalwert (P = 0,001). Freies Cholesterin (P = 0,22) sowie Cholesterinester steigen an (P = 0,014). Der Anstieg der beiden Cholesterinfraktionen geht sogar über den Normalwert hinaus (P = 0,14 bzw. P = 0,22). 10 mg Inosit haben gegenüber 5 mg pro 10 g Futter keinen statistisch nachweisbar stärkeren Effekt auf die Normalisierung der Leberlipoide. Eine völlige Wiederherstellung einer physiologischen Verteilung der Leberfettfraktionen wird durch Inosit *nicht* erreicht.

Die Intensität der Phosphatidneubildung geht aus den Versuchen mit P^{32} hervor. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (als Mittelwerte von je 2 Versuchsgruppen) zusammengestellt.

Tabelle 2.

	Zahl der Tiere	Gesamtlipoide in % Trockensubstanz	Phosphatide in % Ges. Lip.	Impulse/mg	
				Ges. Lip.	Phosphatide
Normal	5	15,0	36,7	9,0	0,96
	5	18,1	39,2	10,0	1,0
Mangelkost	5	28,1	35,6	4,4	0,49
	5	31,7	32,8	5,5	0,66
Mangelkost + 5 mg Inosit/10 g	5	27,6	41,7	7,1	0,67
	5	19,0	40,7	8,5	0,80
Mangelkost + 10 mg Inosit/10 g	5	23,2	40,5	8,6	0,84
	5	23,4	39,8	7,5	0,74

Es ist ersichtlich, daß unter der Mangelkost der Einbau von P^{32} in die Leberphosphatide um etwa 50% absinkt. Unter der Insitwirkung steigt

er wieder um etwa 50% des Mangelkostwertes an. Zwischen den Dosierungen des Inosits besteht kein signifikanter Unterschied mehr. Eine Wiederherstellung der physiologischen Phosphatidsynthese ist mit Inosit anscheinend nicht zu erreichen.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen zunächst, daß Inosit die Leberverfettung von Ratten, die mit einer vollcalorischen aber fettfreien hypolipotropen, d. h. an lipotropen Substanzen wie Methionin und Cholin armen Kost erzeugt war, teilweise zu verhindern vermag. Quantitativ wird der Effekt des Methionins und Cholins nicht erreicht. Der Wirkungsmechanismus des Inosits entspricht dem für Methionin und Cholin beschriebenen. Die Neutralfette werden erheblich gesenkt. Die Phosphatide, das freie Cholesterin und die Cholesterinester steigen an. Das Wesen der Insitwirkung ist also eine Überführung des Neutralfettes in Phosphatide und Cholesterinester. Er fördert die Bildung der Esterformen der Fettsäuren, die für ihren Transport und ihre Rolle im Stoffwechsel von Bedeutung sind. Der Weg der Inositwirkung ist also an der Mangelkostratte der gleiche wie bei der Mobilisation des unter Tetrachlorkohlenstoffwirkung in die Leber eingelagerten Neutralfetts von Hund und Ratte. Wie hier, dienen die Ergebnisse der Verwertung von P^{32} in der Phosphatidsynthese dem Verständnis der Inositwirkung. Verglichen mit dem Normaltier sinkt bei Mangelkost unter sonst gleichen Bedingungen die in einer bestimmten Zeit — hier in 16 Std — in die Leberphosphatide eingebaute Phosphormenge auf die Hälfte des Normalwertes ab. Die Phosphatidsynthese ist also durch die einseitige Kost teilweise blockiert. Inosit hebt die Blockade nicht völlig auf. Gerade an diesem Test ist die begrenzte Wirkung des Inosits und die Nutzlosigkeit einer Dosissteigerung deutlich.

Offen bleibt die Frage, ob Inosit direkt, etwa als Grundstoff von Inositphosphatiden oder indirekt durch Ersparung oder Mobilisierung anderer lipotroper Substanzen die Phosphatidsynthese fördert. Die letzte Möglichkeit ist wahrscheinlicher, nachdem sich gezeigt hat, daß Inosit den Eiweißumssatz fördert. Aktivität und Freßlust der Tiere steigen, die Stickstoffausfuhr im Urin ist erhöht. Bei untercalorischer Kost sinkt das Gewicht der Tiere um so stärker und schneller ab, je höher die gegebene Inositmenge ist. Wenn es den Tieren verwehrt ist, den durch Inosit offenbar gesteigerten Stoffwechsel durch entsprechende Nahrungsaufnahme zu befriedigen, sterben sie in ungewöhnlich hoher Quote, die, wie die vorliegenden Versuche zeigen, wieder mit der Inositdosis steigt. Diese Erfahrung berechtigt dazu die Erklärung für die lipotrope Wirkung des Inosits in einer Freisetzung von Methionin im Rahmen eines gesteigerten Eiweißkatabolismus zu suchen.

Zusammenfassung.

An 106 Ratten werden Versuche mit der Bestschen Mangelkost durchgeführt. Unter dieser fettfreien und an lipotropen Substanzen armen Kost kommt es zu einer Leberverfettung mit Anstieg der Neutralfette

und Absinken der Phosphatide. Inosit, in einer Dosis von 5 mg pro 10 g Nahrung gegeben, senkt statistisch gesichert den Gesamtfett- und Neutralfettgehalt. Die Cholesterinfraktionen und der Phosphatidgehalt steigen. Die unter der Mangelkost erheblich absinkende Verwertung von P^{32} für die Phosphatidsynthese wird durch Inosit verbessert. Es gelingt jedoch nicht, durch Inosit völlig physiologische Leberlipoidwerte wiederherzustellen. Die Wirkung des Inosits wird in einer Freisetzung körpereigenen Methionins durch Aktivierung des Eiweißkatabolismus gesehen.

Literatur.

Abels, J. S., C. W. Kupel, G. T. Pack and C. P. Rhoads: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **54**, 157 (1943). — Ariel, I. M., I. C. Abels, H. T. Murphy, G. T. Pack and C. P. Rhoads: Ann. Int. Med. **20**, 570 (1944). — Best, C. H., C. C. Lucas, J. H. Ridout and J. M. Patterson: J. of Biol. Chem. **186**, 317 (1950). — Best, C. H., C. C. Lucas, J. M. Patterson and J. H. Ridout: Biochemic. J. **48**, 452 (1951). — Best, C. H., J. H. Ridout, J. M. Patterson and C. C. Lucas: Biochemic. J. **48**, 448 (1951). — Broun, G. O.: Postgrad. Med. **4**, 203 (1948). — Echaurren, A. P., and R. Jorquera: J. Amer. Med. Assoc. **124**, 66 (1944). — Gavin, G., and E. W. McHenry: J. of Biol. Chem. **139**, 485 (1941). — Gephardt, M. C.: Ann. Int. Med. **26**, 764 (1947). — Hartmann, F.: Naturwissenschaften **41**, 231 (1954). — Hartmann, F., R. Hertel, G. Schulze u. H. Wellmer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 152 (1952). — Hartmann, F., Fr. Ruwe u. G. Schulze: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 98 (1953). — McHenry, E. W., and J. M. Patterson: Physiologic. Rev. **24**, 128 (1944). — Pätau, K.: Z. Biol. **63**, 152 (1943).

Dr. Fritz Hartmann, Göttingen, Med. Univ.-Klinik und Poliklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 327–337 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle).

Zur Frage einer Campherwirkung auf Synapsen im motorischen und vegetativen Nervensystem.

Von
H. Rohr.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. November 1954.)

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die gelegentliche Beobachtung, daß bei der Campherlähmung unter Einwirkung von Campherdämpfen (Vorlesungsversuch am Frosch unter der Glasglocke) eine Aufhebung der indirekten Erregbarkeit des Muskels bei Reizung des freigelegten N. ischiadicus nachgewiesen werden konnte. Eine gewisse Parallele zu der vermuteten Blockierung der neuromuskulären Synapsen konnte in der Aufhebung der elektrischen Vagusreizeffekte nach Camphergaben an Kaninchen (Loewi) gesehen werden. Hier könnten die Synapsen der parasympathischen Ganglien blockiert sein, weil die Wirkungen parasympathischer Erregungsgifte am Erfolgsorgan unter gleichen Bedingungen nicht oder nur wenig vermindert zu sein pflegen.

I. Motorische Campherlähmung.

Harnack und Witkowski berichteten 1876, daß der Frosch unter Campher völlig gelähmt wird, während das Säugetier auf Campher mit Krämpfen reagiert. Wiedemann zeigte wenig später, daß der Campher beim Frosch die Quer- und Längsleitung im Rückenmark lähmt, bevor ein hypothetisches Krampfzentrum erregt wird. Er setzte Frösche unter die „Campherglocke" und reizte das Rückenmark der Tiere in verschiedenen Höhen elektrisch, wenn mechanische oder chemische Reize nicht mehr beantwortet wurden. Setzte er die Elektrode auf die Gegend der Medulla oblongata, so erfolgten schwache Bewegungen der vorderen Extremitäten. Reizte er in tieferen Regionen, so reagierten die Hinterbeine mit schwachen Zuckungen. Nach einiger Zeit unterblieb jede Reaktion. In diesem Stadium soll eine curareartige Lähmung an den motorischen Nervenendigungen bestehen. Wiedemann fand, daß selbst stärkere Ströme bei Nervenreizung nur zu sehr schwacher Zuckung führten, während bei der Muskelreizung die Erregbarkeit erhalten blieb.

Ähnliche Beobachtungen machten Heinz sowie Jacoby, Hayaschi und Scubinski, so daß seit Wiedemann die Campherlähmung als curareartige Wirkung gedeutet wurde. Stross hat dann 1922 in einer experimentellen Analyse diese curareartige Wirkung des Camphers am Frosch widerlegt. Er stellte fest, daß die indirekte Erregbarkeit des Muskels nach Injektion von Campherlösungen in den Brustlymphsack nicht beeinflußt wird. Selbst die vierfach tödliche Dosis habe bis zum Stillstand des Herzens, also lange nach Eintritt der vollen Lähmung, keinen

Effekt. Im Gegensatz dazu wurde die Erregbarkeit des Nerven bei Campher-Injektion in den gleichseitigen Schenkellymphsack herabgesetzt. Auch wenn der Frosch aus einer camphergesättigten Badeflüssigkeit das Gift resorbierte, verschwand allmählich die indirekte Erregbarkeit. Daraus folgerte Stross, daß der Campher infolge seiner guten Lipoidlöslichkeit nach dem Eindringen durch die Haut auch auf den Nervenstamm wirkt und die Leitfähigkeit aufhebt. Bei den Versuchen Wiedemanns unter der Campherglocke handelte es sich ebenso um eine percutane Campheraufnahme. Stross beobachtete ferner, daß die indirekte Erregbarkeit eines Nerv-Muskel-Präparates erlosch, wenn er auf den Nerven einen mit Campher-Ringer getränkten Wattebausch auflegte.

Nach diesen Feststellungen kommt es also beim Frosch nach Campherresorption wohl in erster Linie zu einer zentralen Lähmung und nur bei direkter (auch percutaner) Einwirkung zu einer Lähmung der Leitfähigkeit des peripheren Nerven. In eigenen Versuchen stellten wir bei einer Dosiswirkungsbestimmung an Sommerfröschen fest, daß eine totale Lähmung erst bei Dosen oberhalb von 300 mg/kg erfolgte, während bei Hunden, Katzen und Kaninchen mit 10 mg/kg schon Krampfeffekte erzielt werden (vgl. unten). Diese Diskrepanz läßt vermuten, daß in der phylogenetischen Reihe die zentralnervösen Substrate, die durch Campher erregt werden, beim Warmblüter empfindlicher sind. Jedenfalls deutet die Tatsache, daß Campherkrämpfe durch coordinierte Bewegungen gekennzeichnet sind, auf eine Lokalisation in höheren Zentren hin (Wiedemann). Vom Rückenmark gehen die Krämpfe sicher nicht aus, denn Wiedemann sah an Kaninchen, denen er das Rückenmark hoch unterhalb der Medulla oblongata durchschnitten hatte, keine Krämpfe mehr auftreten.

In einigen Versuchen an Fröschen konnte ich die Befunde von Stross bei einer erweiternden Analyse nach Claude Bernard bestätigen.

Es wurde an dezerebrierten Tieren der N. ischiadicus beider Hinterextremitäten frei präpariert und anschließend die Extremität eines Oberschenkels so abgeschnürt, daß der Nerv als einzige Brücke intakt blieb. Borneol-Campher wurde als Emulsion aus einer alkoholischen Stammlösung 1 : 10 mit 0,5%igem Adhaegon-Ringer verdünnt (Endkonzentration 1 : 50) und in den Bauchlymphsack injiziert. Unmittelbar nach Eintritt der Campherlähmung wurden indirekte und direkte Erregbarkeit an beiden Beinen miteinander verglichen. Es fand sich kein Unterschied der Erregbarkeit.

Die Prüfung der Wirkung auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung am *Warmblüter* in situ erwies sich als schwieriger wegen der zentralen Nebenwirkungen. Deshalb wurde der Campher durch einen Seitenast der A. femoralis in die Hinterextremität eines Hundes (9 kg Gewicht, Morphin-Chloralose-Urethan-Narkose) injiziert. Um hohe Dosen geben zu können, ohne dabei allzu starke Verdünnungen des Blutes zu verursachen, mußte auch hier eine milchige Emulsion von Borneol-Campher (Endkonzentration 1 : 50) verwendet werden. Dabei konnte man Embolien durch Campherkristalle nicht ausschließen. Campherdosen bis 175 mg, die in dieser Weise appliziert wurden, hatten keinen

Einfluß auf die indirekte Erregbarkeit des Muskels. Eine exakte Dosenberechnung ist hier nicht möglich. Höhere Dosierung erschien für die Beweisführung aber nicht notwendig.

Nach diesen Befunden ist also eine neuromuskuläre Lähmung durch Campher ausgeschlossen. Die Lähmung des Frosches scheint auf einer zentralen Wirkung zu beruhen. Diese läßt sich offenbar nur am Kaltblüter und bei niederen Tierarten zeigen, bei denen keine Krampferscheinungen auftreten.

Wir ermittelten gelegentlich im Schwimmversuch bei einigen weiteren Tierarten die lähmenden Grenzkonzentrationen: Stichlinge wurden nicht gelähmt in Konzentrationen bis 10^{-4} (Campher offic.), Kaulquappen wurden reversibel gelähmt mit 10^{-4} bis 2×10^{-4} (Campher offic.), Enchyträen wurden in Konzentrationen bis $3{,}3 \times 10^{-4}$ nicht gelähmt (Japan-Campher), mit Borneol-Campher erfolgte ab 2×10^{-4} volle Lähmung. Kontrollversuche mit gleichen Alkoholkonzentrationen, wie sie bei der Verdünnung erforderlich waren, zeigten keine Beteiligung der Alkoholwirkung. In früheren Versuchen hatten Stapenhorst u. Mitarb. am motorischen Ganglion des Gelbrandkäfers nur Erregungen ab 10^{-5} gefunden.

II. Campherwirkung auf den Vagusreizerfolg.

Schultze u. Lendle haben die Möglichkeit diskutiert, daß Campher analog dem Tetraäthylammoniumbromid und dem Nicotin intramurale Ganglien des Herzens zu lähmen vermag, denn seit Harnack u. Witkowski ist bekannt, daß Campher elektrische und zum Teil auch pharmakologische (Muscarin-) Vagusreizeffekte aufhebt.

Mehrere spätere Arbeiten bestätigen diese Befunde (Ellinger, Stross, Navratil[1], Loewi und andere). Die Deutung für dieses Verhalten des Camphers sahen manche Autoren in einer direkten Erregung des Ventrikelmuskels (Harnack und Witkowski), andere in einer fördernden Wirkung auf die Reizerzeugung (Gottlieb). Böhme hatte 1905 den Antagonismus von Campher gegen die Vergiftung des Froschherzens mit Chloralhydrat nachgewiesen. Rohde zeigte später, daß die Chloralhydratvergiftung vorwiegend die reizbildenden Zentren im Herzen treffe. Auch von Konschegg deutete die Campherwirkung als Erregung der reizbildenden Zentren im Herzen. Er fand, daß Campher ähnlich wie Adrenalin die Reizbildung im Herzen erregte, wenn durch Calciumentzug der Ventrikel bereits diastolisch erschlaffte. Schließlich sollten nach Fröhlich und Grossmann auch die dem Sinusknoten untergeordneten Reizerzeugungsstellen und ebenso die Reizleitung gefördert werden. So würde durch den Campher die Reizbildung von sekundären Zentren angeregt, die dem hemmenden Einfluß des Vagus weniger ausgesetzt sind als die Zentren des Sinusknotens.

Es spricht also vieles für die Deutung, daß die Aufhebung des Vagusreizerfolges durch Campher nur eine *„scheinbare Vaguslähmung"* darstellt.

a) Versuche am perfundierten Froschherzen bei zentraler Vagusreizung. Zunächst wurden die von Schultze u. Lendle beschriebenen Ergebnisse mit verfeinerter Methodik nachgeprüft. Sie hatten das Froschherz in situ von der Vena cava caudalis her durchströmt und dabei die vom

Herzen ausgeworfene Flüssigkeitsmenge durch einen Längsschnitt vor der Gabelung aus der Aorta ausfließen lassen. So war eine direkte Einwirkung des Camphers auf den Stamm des Herzvagus nicht auszuschließen. In meinen Versuchen habe ich bei gleicher Versuchsanordnung entsprechend der Methode von Bülbring die vom Herzen geförderte Flüssigkeitsmenge abgeleitet.

Das Herz förderte sein gesamtes Schlagvolumen über eine konstante Ausflußhöhe von 120 mm Wasserdruck. Der Druck der aus einer Mariotteschen Flasche in die Vena cava einfließenden Ringer-Lösung wurde zu Beginn des Versuches auf 20—30 mm eingestellt und nicht weiter geändert. Die Reizung erfolgte wie bei Schultze und Lendle mit einer feinen Gabelelektrode, die von der Dekapitationsschnittfläche (zwischen Augen und Ohrblasen) aus in den nicht ausgebohrten Rückenmarkskanal hineingesteckt wurde. Bei der Dekapitation in dieser Höhe bleibt die Medulla oblongata und das Gebiet der Vaguskerne unversehrt. Die Elektrode wurde mit Hilfe eines Feintriebes grundsätzlich 9 mm tief in den Rückenmarkskanal vorgeschoben. Die Reizung erfolgte mit einem Reizgerät („Megatest" Kroebel), welches erlaubt, unabhängig voneinander Reizstärke, Impulsdauer und Frequenz der Impulsfolge rechteckiger Stromstöße zu variieren. Die Reizdaten wurden je nach Reizerfolg im Bereich einer Stromstärke zwischen 3 und 8 mA und einer Frequenz zwischen 3 und 8 Impulsen pro Sekunde eingestellt. Die Stromflußdauer betrug in allen Versuchen 1 msec. Das so hergestellte Versuchsobjekt blieb vom Zeitpunkt der Dekapitation an für 2 Std voll brauchbar, obwohl eine Sauerstoffversorgung des Rückenmarks bei mangelnder Durchblutung nicht stattfand. Sicherheitshalber wurde grundsätzlich an jedem Präparat nur eine Stoffkonzentration bzw. Stoffkombination perfundiert, um die optimale Zeitspanne bei der Prüfung möglichst nicht zu überschreiten. Herzfrequenz und Minutenvolumen wurden vor und während der Reizung (Dauer 1 min) gemessen. Die Vagusreizungen erfolgten im Abstand von mindestens 5 min, um eine vorzeitige Ermüdung zu vermeiden. Nach Einstellung der elektrischen Reizdaten für den gewünschten Reizerfolg wurden jeweils mindestens 2 Reizungen unter Ringer-Perfusion bis zur Herstellung eines steady state durchgeführt, dann auf Campherperfusion umgeschaltet und nach Konstanz der pharmakologischen Wirkung wieder auf Ringer-Perfusion zurückgeschaltet. Auf diese Weise war es möglich, die Wirkung des Camphers auf die Herzleistung und auf den Vagusreizerfolg festzulegen und die Reversibilität zu prüfen.

Campher hatte in einer Grenzkonzentration von 10^{-5} häufig eine fördernde Wirkung auf das Minutenvolumen, während die Frequenz kaum beeinflußt, eventuell gering vermindert wurde. In der gleichen Konzentration schwächte Campher den Vagusreizerfolg erheblich ab. Diese Wirkung war reversibel. Erst bei Verwendung von Konzentrationen 10^{-4} war in der Beobachtungszeit keine Reversibilität mehr nachweisbar. Die Eigenwirkung auf Frequenz und Minutenvolumen war nicht reversibel (vgl. Tab. 1).

Um auszuschließen, daß die hemmende Wirkung auf den Vagusreizerfolg über eine Tonisierung des Herzsympathicus zustande kommt, wurde der sympathische Anteil im Herzen durch Dihydroergotamin (DHE 45 der Firma Sandoz) ausgeschaltet (dem Adrenalin-Antagonismus am Froschherzen [Navratil(2)] entsprechend). In Vorversuchen bei

Perfusion mit DHE-Konzentrationen von 10^{-5} wurde festgestellt, daß der Vagusreiz stärker beantwortet wird als bei der RINGER-Perfusion.

Tabelle 1.
Frosch 11, R. esc. 24. 11. 53. Reizdaten: 5 mA, 1 msec, 5 Imp/sec.

Uhrzeit	Frequenz pro min	Min. Vol in cm³	Frequenz unter Vagusreizung	Min. Vol
16.20	44	2,2	12	0,2
25	45	2,4	16	0,1
16.28	Campher-RINGER (3×10^{-5})			
34	44	3,6	41	1,9
39	45	3,6	39	2,2
16.42	RINGER-Perfusion			
17.02	36	3,2	19	0,1
10	38	3,4	18	0,2

Tabelle 2.
Frosch 18, R. esc. 13. 1. 54. Reizdaten: 8 mA, 1 msec, 8 Imp/sec.

Uhrzeit	Frequenz pro min	Min. Vol in cm³	Frequenz unter Vagusreizung	Min. Vol
17.42	48	2,4	22	0,1
47	44	2,4	12	0,1
17.49	Dihydroergotamin (10^{-5})			
57	39	2,0	3	–
18.11	34	1,5	2	—
18.14	RINGER-Perfusion			
37	34	1,8	13	0,1
50	34	2,0	13	0,1

Tabelle 3.
Frosch 21, R. esc. 15. 1. 54. Reizdaten: 5 mA, 1 msec, 5 Imp/sec.

Uhrzeit	Frequenz pro min	Min. Vol in cm³	Frequenz unter Vagusreizung	Min. Vol
18.02	59	3,4	2	—
06	59	4,0	3	0,1
18.08	Campher (3×10^{-5}) und Dihydroergotamin (10^{-5})			
14	55	3,7	44	1,9
19	47	3,9	42	1,9
24	46	3,9	39	1,8
18.27	RINGER-Perfusion			
32	49	4,3	7	0,1
38	47	4,6	7	0,1

Diese Wirkung war reversibel (vgl. Tab. 2). Bei Kombination einer sicher wirksamen Campherkonzentration (3×10^{-5}) mit DHE (10^{-5}) zeigte sich das gleiche Bild der Vagushemmung durch Campher (vgl. Tab. 3). Daraus läßt sich schließen, daß die Campherwirkung nicht über

eine Erregung sympathischer Mechanismen, welche von der Herzhöhle her zu erreichen sind und sich durch DHE blockieren lassen, zustande kommt.

Wenn der Campher über eine Blockierung parasympathischer Ganglien im Herzen wirken sollte, wäre eventuell zu erwarten, daß Prostigmin diese Wirkung abschwächen könnte. Prostigmin soll in bestimmten Dosierungsbereichen auch gegen Ganglienblocker antagonistisch wirken (siehe bei Erdmann u. Mercker). Zunächst wurde die Prostigminwirkung allein geprüft. Bei nur geringer Frequenzwirkung ist unter Prostigminkonzentrationen von 10^{-6} das Minutenvolumen verringert. Am Vagusreiz sieht man eine Verstärkung (vgl. Tab. 4). Bei der Kombination von Campher (3×10^{-5}) mit Prostigmin (10^{-6}) ist die Vagushemmung durch Campher unabgeschwächt vorhanden (vgl. Tab. 5).

Tabelle 4.
Frosch 24, R. esc. 16. 2. 54. Reizdaten: 5 mA, 1 msec, 5 Imp/sec.

Uhrzeit	Frequenz pro min	Min. Vol in cm³	Frequenz unter Vagusreizung	Min. Vol unter Vagusreizung
16.08	63	4,9	3	0,4
13	59	5,0	3	0,4
16.18	Prostigmin (10^{-6})			
23	60	4,1	2	0,2
28	56	3,9	3	0,2
34	49	3,8	2	0,2
16.38	Ringer-Perfusion			
43	56	5,4	2	0,3
53	59	5,8	1	0,2

Tabelle 5.
Frosch 25, R. esc. 17. 2. 54. Reizdaten: 8 mA, 1 msec, 5 Imp/sec.

Uhrzeit	Frequenz pro min	Min. Vol in cm³	Frequenz unter Vagusreizung	Min. Vol unter Vagusreizung
2.03	55	4,9	8	0,3
08	57	4,9	10	0,6
2.11	Campher (3×10^{-5}) und Prostigmin (10^{-6})			
16	55	4,9	48	2,9
21	55	3,4	43	2,5
26	50	3,4	44	2,2
2.29	Ringer-Perfusion			
34	48	3,5	—[1]	0,2
39	48	4,6	—[1]	0,2

[1] Nur wurmförmige Bewegungen, keine geordnete Kontraktion, Prostigmin läßt sich bekanntlich schwer auswaschen. So verschwindet hier beim Auswaschen nur der Campherеffekt, während das Prostigmin nachwirkt.

Es zeigte sich also, daß die Vagushemmung auch dann eintritt, wenn das Herz isoliert durchströmt wird und Einwirkungen des Camphers auf extrakardiale Vagusteile nicht zu erwarten sind. Das Substrat, an dem der Campher seine Wirkung entfaltet, muß also — am Froschherzen zumindest — von den Herzhöhlen her erreichbar sein. Dabei fällt auf, daß die Hemmung des Vagusreizerfolges sich vor allem in dem Verhalten der Herzfrequenz wiederspiegelt, während das Minutenvolumen weniger stark verändert wird. Dieser Befund läßt sich gut in die Reihe der Angaben von Böhme, v. Konschegg, Fröhlich u. Grossmann einordnen und spricht für eine Wirkung besonders auf die Reizbildung. Die Tatsache, daß vorwiegend parasympathisch und sympathisch wirksame Stoffe (Prostigmin und DHE) diesen Effekt praktisch nicht beeinflussen, wäre eine weitere Stütze für die genannte Deutung. Eine direkte Erregungswirkung des Camphers auf die Reizbildung war am intakten Herzen zwar nicht als Frequenzsteigerung in Erscheinung getreten, sie dürfte vielleicht mehr im Antagonismus zu lähmenden Effekten, wie z. B. bei Schädigung der Reizbildung mit Chloralhydrat (siehe oben) erkennbar werden.

b) *Versuche am Warmblüter.* Campher wurde für die folgenden Versuche in Äthanol 1 : 10 gelöst und mit 0,5%igem Adhaegon-Ringer weiter verdünnt. Wegen der Flüchtigkeit der Wirkungen wurden unmittelbar an die intravenösen Stoßinjektionen meist Dauerinfusionen angeschlossen, bei denen eine der vorausgehenden Stoßinjektion entsprechende Dosis auf die in einer Stunde einfließende Flüssigkeitsmenge verteilt war. So wurde versucht, die Campherwirkung einigermaßen konstant zu halten.

An Hunden (Narkose: Morphin-Chloralose-Urethan 4—80—250 mg/kg) wurde an den re. Vagus eine Elektrode angelegt, beide Vagi blieben zunächst undurchschnitten. Die Reizung erfolgte mit rechteckigen Stromstößen („Megatest"[1] Kroebel) von supramaximaler Stromstärke (10—15 mA), einer Stromflußdauer von 0,1 msec und einer Impulsfrequenz von 50 pro sec. Registriert wurden Blutdruck (Marey-Kapsel) und Pulsfrequenz (Ordinatenschreiber[1] nach Genuit) auf dem Rußkymographen.

Zunächst wurden bei *intakten Vagi* die Reizerfolge einer 30 sec langen hochfrequenten Vagusreizung vor und nach Camphergaben (5 mg/kg, anschließend Dauerinfusion 5 mg/kg/60 min i.v.) miteinander verglichen. Es zeigte sich eine deutliche Abschwächung der Reaktion unter Campher. Wurde der Versuch nach *Bivagotomie* wiederholt, so ließ sich nun kein Unterschied der Vagusreizeffekte vor und nach Camphergaben erkennen (vgl. Abb. 1). Allerdings war nach der Vagotomie die Ausgangsfrequenz (300 pro Minute) gegenüber der Ausgangsfrequenz vor Bivagotomie (140 pro Minute) sehr erheblich beschleunigt. Man könnte also die kritische Auffassung vertreten, daß nach der Vagotomie eine Beschleunigung der Herzfrequenz durch Campher nicht mehr

[1] Die Überlassung dieser beiden Geräte als Leihgabe verdanken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

eintreten kann, wie sie in den Versuchsabschnitten vor Vagotomie nach Campher, besonders im Anschluß an die zweite Vagusreizung, zu erkennen ist. Gerade dieser Versuch spricht aber gegen die mögliche Deutung einer Campherwirkung durch Erhöhung der Reizbildung vom Vasomotorenzentrum aus. Denn in der zweiten Versuchsperiode war, trotz starken Überwiegens des Accelerans nach Bivagotomie, der Vagusreizeffekt bei gleichen Reizbedingungen viel stärker.

In weiteren Versuchen an Hunden (Narkose wie oben) wurde der Vagusreizerfolg durch Auszählen der Herzfrequenz unter Reizung mit *steigenden Impulsfrequenzen* (0,5—100 Impulse pro Sekunde) ermittelt.

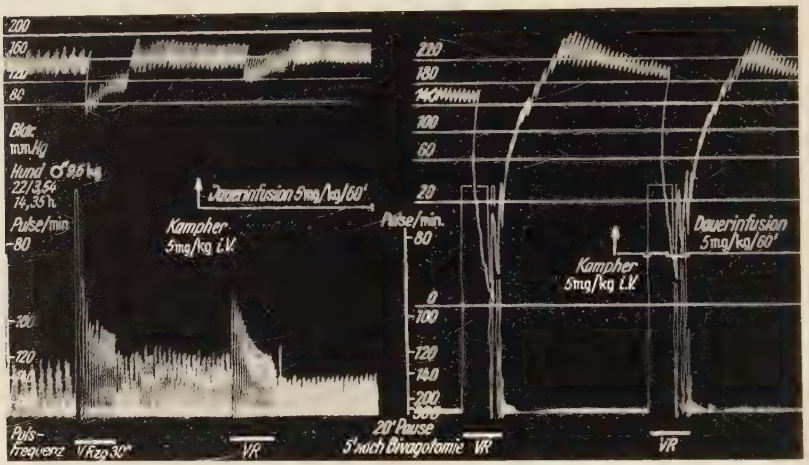


Abb. 1. Hund, männlich, Gewicht 9,6 kg, Narkose siehe Text, 22. 3. 1954. Oben Blutdruck, unten Pulsfrequenz (Ordinatenschreiber). Die linke Hälfte der Kurve zeigt den Erfolg einer hochfrequenten Reizung des rechten Vagus. Beide Vagi sind intakt (Daten der elektrischen Reizung: 0,1 msec 10 mA. 50 Imp/sec, Reizdauer 30 sec). Der Vagusreizerfolg ist nach Camphergabe deutlich abgeschwächt. Auf der rechten Hälfte ist der gleiche Versuch nach Bivagotomie registriert. Jetzt ist der Vagusreizerfolg nach Camphergabe nicht mehr abgeschwächt, siehe Text.

Stromstärke (mit 15 mA supramaximal) und Stromflußdauer (0,1 msec) wurden dabei nicht verändert („Frequenzspektrum" nach Erdmann u. Mercker).

Bei intakten Vagi war unter diesen Versuchsbedingungen nur eine sehr geringe Abschwächung des Vagusreizerfolges nach Camphergaben zu sehen (5 mg/kg, anschließend Dauerinfusion 5 mg/kg/60 min i.v.). Diese Abschwächung bleibt jedoch im Bereich der Streuung. Nach Bivagotomie wurde der Vagusreizerfolg durch Camphergaben überhaupt nicht beeinflußt (vgl. Abb. 2). Auch eine bivagotomierte Katze (Narkose: Chloralose-Urethan, 60—250 mg/kg) zeigte bei der Prüfung des Frequenzspektrums keine Änderung des Vagusreizerfolges nach Camphergaben.

Nachdem unter Campher am Warmblüter keine direkte Lähmung der Synapsenübertragung im parasympathischen Herzganglion nachgewiesen werden konnte, wurden einige Versuche über die Campherwirkung auf die synaptische Erregungsübertragung im sympathischen Ganglion cervicale angestellt (Nickhaut der Katze). Bei präganglionärer elektrischer Reizung wurde der Erfolg an der Nickhautkontraktion registriert. Campherinjektionen von 1, 2 und 5 mg/kg i.v. hatten keinen hemmenden Einfluß. Höhere Dosen (10 mg/kg) führten zu Krämpfen, die die Registrierung störten.

Außerdem wurde bei einem bivagotomierten Hund der Einfluß von Campher auf Blutdruck und Pulsfrequenz unter experimentellem

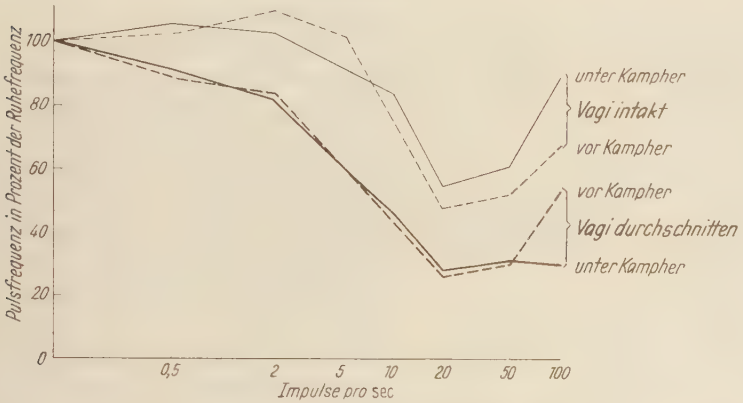


Abb. 2. Versuch am Hund, weiblich, Gewicht 9,3 kg, Narkose siehe Text (23. 3. 54). Vagusreizerfolg bei Reizung mit verschiedenen Impulsfolgefrequenzen. Auf der Ordinate sind die Reizerfolge (Pulsfrequenz) in Prozent der Ruhepulsfrequenz aufgetragen, auf der Abszisse finden sich in logarithmischer Teilung die verschiedenen Impulsfolgefrequenzen. Die beiden oberen Kurven zeigen das Verhalten bei intakten Vagi (durchbrochene Linie = Werte vor, ausgezogene Linie = Werte unter Campher-gabe): sehr geringe Hemmung des Vagusreizerfolges durch Campher. Die beiden unteren Kurven stellen den Reizerfolg nach Bivagotomie dar (durchbrochene Linie = vor, ausgezogene Linie = unter Camphergabe): kein Unterschied der Reizerfolge.

Vagusdauertonus geprüft. Dabei wurde der rechte periphere Vagusstumpf niederfrequent (2 Impulse pro Sekunde, 15 mA, 0,1 msec) über lange Zeit gereizt. Es pflegt sich dann eine gleichmäßige Senkung der Pulsfrequenz bei geringer Blutdrucksenkung einzustellen, die sich über Stunden erhalten läßt. Diese Methode wurde schon von Lendle, Mercker u. Rohr bei Digitalisversuchen angewandt.

In Dosen von 2, 5 und 10 mg/kg i.v. hatte Campher bei dieser Vagusdauerreizung außer einer vorübergehenden geringen Blutdrucksenkung keine Wirkung auf die Pulsfrequenzsenkung unter Vagusreiz. Es war also entgegen den Angaben der Literatur keine Hemmung des Vagusreizerfolges zu erzielen. Deshalb wurden die Versuche von Loewi in der von ihm angegebenen Versuchsanordnung am Kaninchen wiederholt.

An Kaninchen (Narkose: Urethan 1,5 mg/kg i.v.) wurde am *nicht*-durchschnittenen Vagus mit einer Impulsfrequenz von 50 pro Sekunde gereizt. Dabei wurde bei verschiedener Stromflußdauer (0,1, 1,0 und 10 msec) jeweils die Schwellenstromstärke bestimmt, bei der ein Herzstillstand eintrat. Nach Gaben von 5 mg/kg Campher stieg in allen geprüften Impulsdauerbereichen die Schwelle deutlich an. Wurde nun nach längerer Pause, in der die Campherwirkung abklang, dieser Versuch wiederholt, nachdem vorher die Vagi beiderseits durchschnitten waren, dann änderte sich die Reizschwelle nach der Camphergabe nicht mehr (vgl. Abb. 3).

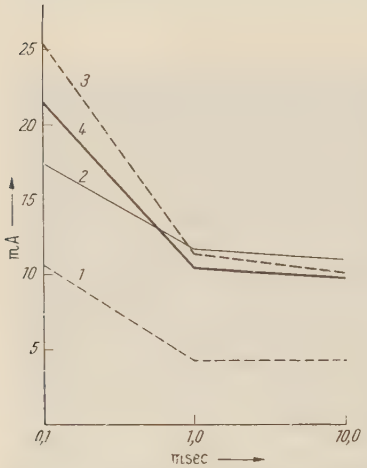


Abb. 3. Versuch am Kaninchen, weiblich, Gewicht 3,87 kg, Narkose siehe Text (24. 6. 1953). Prüfung der Schwellenstromstärke, die bei verschiedener Stromflußdauer Herzstillstand verursachen. Auf der Ordinate ist die Stromstärke (mA), auf der Abszisse die Stromflußdauer (msec) aufgetragen. Bei Prüfung an intakten Vagi ist die Reizschwelle nach Camphergabe deutlich erhöht, eine Stunde nach Bivagotomie zeigt sich keine Änderung der Reizschwelle nach Camphergabe mehr. Die Kurven 1 u. 2 verbinden die Werte bei intakten Vagi, die Kurven 3 u. 4 bei durchschnittenen Vagi (durchbrochen vor, ausgezogene unter Campher).

Bei genauer Durchsicht der Versuche an Hunden und Katzen zeigte sich nun, daß bei bivagotomierten Tieren nie eine Änderung des Vagusreizerfolges auftrat. Nur bei einem Hund, bei dem der linke Vagus undurchschnitten geblieben war, zeigte sich eine Hemmung des Reizerfolges nach Campher. Alle diese Befunde deuten darauf hin, daß die Hemmung des Vagusreizerfolges am Warmblüter wohl auf einem anderen Mechanismus beruhen kann als beim Frosch. Ein Vergleich der Dosen zeigt, daß beim Frosch, bei dem der Hemmungsmechanismus peripher im Herzen zu suchen ist, eine höhere Camphermenge notwendig ist als beim Warmblüter (Grenzkonzentration 10^{-5}). Loewi selbst beschreibt schon Gaben als wirksam, die keinerlei Blutdruckreaktionen hervorrufen. Er verwandte camphergesättigtes Kaninchenserum, konnte also keine genaue Dosierung angeben. In meinen Versuchen sah ich jedoch bei Dosen von 5 mg/kg immer Blutdrucksenkungen. Sie entsprechen theoretisch einer Blutkonzentration von ungefähr 5×10^{-5}. Die wirklich vorliegende Konzentration dürfte aber bei der schnellen Paarung des Camphers mit entgiftenden Stoffen und der schnellen Abwanderung ins Gewebe sicher wesentlich geringer sein. Damit scheint der oben ausgesprochene Schluß wohl berechtigt.

Die beschriebenen Befunde am Warmblüter erlauben jedoch keine einfache Deutung. Mit allem Vorbehalt sei eine Hypothese ausgesprochen: Vielleicht spielt bei der Verminderung der Herzfrequenz unter Reizung des nichtdurchschnittenen Vagus die Mitreizung von afferenten pressorischen Fasern eine Rolle. Durch zentrale Hemmung des Vasomotorenzentrums würde dann auch die Acceleranswirkung nachlassen. Wenn durch Campher das Vasomotorenzentrum erregt wird, dann wäre es vielleicht für den hemmenden afferenten Vagusreiz weniger ansprechbar, so daß die Acceleranswirkung unverändert bliebe und nur die efferente Vaguserregung in Erscheinung tritt. So könnte wenigstens ein Teil der durch Vagusreizung bedingten Pulsverlangsamung unter Campher ausbleiben.

Zusammenfassung.

Die alte Vorstellung Wiedemanns, daß die Campherlähmung auf einer curareartigen Wirkung des Camphers an den neuromuskulären Synapsen beruhe, wird nach Versuchen an Fröschen und Warmblütern in Übereinstimmung mit Stross abgelehnt.

Am isoliert durchströmten Froschherzen nach Bülbring mit Reizung des Vaguskerngebietes wird in Versuchen mit Campher sowie antagonistischen Versuchen mit Campher/Dihydroergotamin und Campher/Prostigmin nachgewiesen, daß die Vagushemmung durch Campher nur eine „scheinbare Vaguslähmung" darstellt.

Bei Hunden, Katzen und Kaninchen verursachen Campherkonzentrationen, die beim Frosch am Herzen wirksam sind, schon Krämpfe. Niedrigere Dosen beeinflussen jedoch den Vagusreizerfolg nur dann, wenn die Nervenleitung im Vagus auch afferent möglich ist.

Literatur.

Böhme, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **52**, 346 (1905). — Bülbring, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **152**, 257 (1930). — Ellinger, P.: zit. nach Gottlieb, S. 1183. — Erdmann, W.-D., u. H. Mercker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 455 (1952). — Fröhlich, A., u. M. Grossmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 177 (1917). — Gottlieb, R.: Hefter-Heubners Handbuch der exper. Pharmakol, I, 1, S. 1147—1198. Berlin: Springer 1923. — Harnack, E., u. L. Witkowski: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **5**, 401 (1876). — Heinz, R.: Virchows Arch. **122**, 116 (1890). — Jacobi, C., Hayashi u. Scubinski: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **50**, 199 (1903). — Konschegg, A. von: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **71**, 251 (1913). — Lendle, L., H. Mercker u. H. Rohr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 352 (1953). — Loewi, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **70**, 336 (1912). — E. Navratil: (1) Pflügers Arch. **210**, 550 (1926). — Navratil, E., u. E. Weniger (2): Klin. Med. **3**, 990 (1946). — Rohde, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **54**, 104 (1906). — Schultze, F., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 95 (1954). — Stapenhorst, K.,: Inaug. Diss. Göttingen 1952, siehe bei Krupp, H., L. Lendle u. K. Stapenhorst; Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 443 (1952). — Stross, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **95**, 304 (1922). — Wiedemann, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **6**, 228 (1877).

Dr. H. Rohr, Göttingen, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 338—340 (1955).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Über die Kreislaufwirkung des Buscopan beim gesunden Menschen.

Von
K. Mechelke und E. Nusser*.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 6. Oktober 1954.)

Da die ganglienblockierende Wirkung des Buscopans (Hyoscin-N-butylbromid) vorwiegend die Erregungsleitung vagaler Impulse hemmt[5], ist es naheliegend, die Kreislaufwirkung dieser Substanz mit der des Atropins und der ganglienblockierenden Pharmaka Pendiomid und Tetraäthylammoniumbromid zu vergleichen. Darüber hinaus wurde die Beeinflussung der Kreislaufänderungen bei orthostatischer Belastung und dem Valsalvaschen Preßversuch durch Buscopan untersucht.

Methodik.

Arterieller Druck: Lilly-Kondensatormanometer (Technitrol Ingeneering Company, Philadelphia), Venendruckschreibung: Strain Gauge Manometer. Volumen und Sauerstoffsättigung des Blutes am Ohr wurden mit rot und ultrarot-empfindlichen Photozellen nach Matthes registriert. Die Hauttemperaturen wurden mit an die Haut angelegten Thermoelementen geschrieben. Atmung: Pneumotachogramm nach Hochrein, Pulsfrequenzschreibung nach Matthes. Die Lageänderungen wurden mit Hilfe eines Kipptisches durchgeführt. Die Injektionen erfolgten i.v. Buscopandosis: 20 mg, Atropindosis: 1 mg. Die Versuche wurden bei Studenten und jungen Kollegen durchgeführt, die sich freiwillig zur Verfügung stellten.

Ergebnisse.

A. Buscopaninjektion (8 Versuche). Besonders auffallend ist die anhaltende Erhöhung der Herzschlagfolge. Mit eintretender Tachykardie wird die respiratorische Arrhythmie aufgehoben. Gleichzeitig erfolgt ein geringer Druckanstieg und eine Abnahme der Druckamplituden. Der Venendruck sinkt etwas ab. Blutgehalt und Sauerstoffsättigung des Blutes am Ohr sowie die Ohrtemperatur zeigen keine Veränderungen (Tab. 1).

Nahezu die gleichen Kreislaufänderungen werden nach Atropin festgestellt[1]. Nach Pendiomid und Tetraäthylammoniumbromid tritt dagegen während einer geringen Drucksenkung und Pulsfrequenzzunahme

* Unter Mitarbeit von cand. med. Th. Pfleiderer.

an Ohr und Finger eine deutliche Volumenzunahme mit Aufbesserung der Sauerstoffsättigung des Blutes bei Anstieg der Hauttemperaturen ein[2].

Tabelle 1.

Mittelwerte der prozentualen Druck- und Pulsfrequenz nach Buscopan (8 Versuche).

Druck- und Pulsfrequenzwerte vor Buscopaninjektion: 100%.

Sekunden nach Injektionsende	Pulsfrequenz	Systolischer RR	Diastolischer RR	Druckamplitude
30	+ 28	+ 5	+ 9,5	— 3,3
60	+ 34	+ 1,5	+ 7	— 7,6
300	+ 36	— 2	+ 4,8	— 11,4

B. Orthostatische Kreislaufänderungen nach Buscopan (10 Versuche) *und Atropin* (20 Versuche). Ein ausgeprägter Druckabfall während orthostatischer Belastung nach Buscopan wurde in 4 von insgesamt 10 Versuchen gesehen. Die Untersuchung mußte infolge der auftretenden Kollapssymptome vorzeitig unterbrochen werden. Nach Atropin dagegen wurde in keinem der 20 Versuche ein orthostatischer Kollaps beobachtet. Bei prozentualer Auswertung der orthostatischen Blutdruck- und Pulsfrequenzänderungen nach Buscopan und Atropin sieht man einen geringeren Blutdruckabfall und Pulsfrequenzanstieg nach Atropin (Tab. 2). Pendiomid und Tetraäthylammoniumbromid schränken die Toleranz für die orthostatische Belastung so erheblich ein, daß fast regelmäßig ein Kollaps erfolgt[2, 4].

Tabelle 2.

Mittelwerte der prozentualen Druck- und Pulsfrequenzänderungen bei orthostatischer Belastung vor und nach Buscopan (10 Versuche) und Atropin (20 Versuche).

Druck- und Pulsfrequenzwerte vor orthostatischer Belastung: 100%.

	Vor Buscopan				Nach Buscopan			
	Systol. RR	Diastol. RR	Druckamplitude	Pulsfrequenz	Systol. RR	Diastol. RR	Druckamplitude	Pulsfrequenz
2—4 min n. Lagewechsel	—12	— 2	— 23	— 24	— 31	— 21	— 50	+ 30
	Vor Atropin				Nach Atropin			
2—4 min n. Lagewechsel	— 10,5	— 2	— 21,4	+ 20	— 14	— 4	— 29	— 25

C. Preßversuche nach Buscopan (24 Versuche). Es tritt ein verstärkter pressorischer Druckabfall mit kleineren Amplituden auf (Abb. 1). Der pressorische Wiederanstieg des Blutdruckes verbleibt unter den präpressorischen Werten. Postpressorisch erreicht die Pulsfrequenz trotz deutlicher Drucksteigerung nur verzögert ihre Ausgangslage.

Nach Atropin werden während der pressorischen Phase gleiche Kreislaufänderungen beobachtet. Postpressorisch wird im Gegensatz zu

Buscopan eine geringere Druckerhöhung gefunden. Nach Pendiomid ist der pressorische Druckabfall im Vergleich zu Atropin und Buscopan ausgeprägter. Ein pressorischer Wiederanstieg des Druckes wird mehrfach vermißt[3].

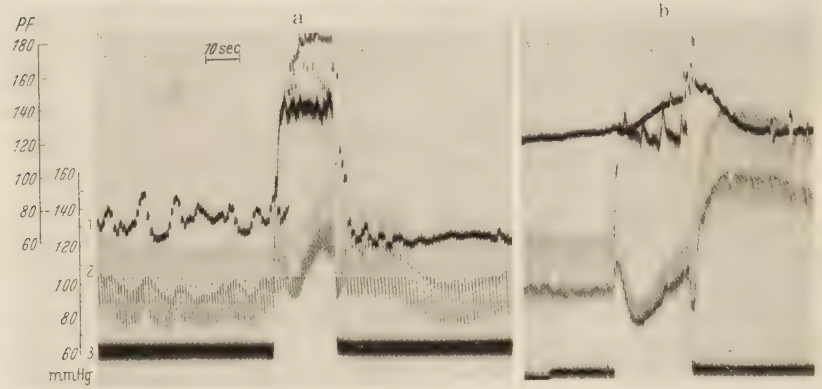


Abb. 1. Vp. K. I., 25 Jahre. Inspiratorischer Preßversuch: 20 sec Dauer, 40 mm Hg Preßhöhe. *a* vor Buscopan, *b* nach Buscopan; *1* Pulsfrequenz, *2* Blutdruck, *3* Preßdrucklinie.

Zusammenfassung.

Nach Buscopan werden nahezu gleiche Kreislaufveränderungen wie nach Atropin festgestellt: anhaltende, erhebliche Tachykardie, initialer geringer Druckanstieg und anschließend geringe Drucksenkung, geringer Venendruckabfall bei unveränderter peripherer Durchblutung.

Die ganglienblockierende Buscopanwirkung läßt sich in Form einer Verminderung der Toleranz gegenüber Blutverteilungsänderungen nachweisen. Während der orthostatischen Belastung wird ein stärkerer Blutdruckabfall beobachtet. Bei 4 Personen traten Kollapssymptome auf. Nach Atropin sinkt der Druck während der orthostatischen Belastung im Vergleich zu Buscopan geringer ab. Beim Valsavaschen Preßversuch tritt nach Buscopan während der pressorischen Phase ein erhebliche Druckabfall mit Amplitudenverkleinerung auf.

Literatur.

[1] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart: Thieme 1951. — [2] Mechelke, K., u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 1 (1951). — [3] Mechelke, K.: Z. klin. Med. **150**, 365 (1953). — [4] Mechelke, K.: Z. klin. Med. **150**, 551 (1953). — [5] Wick, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 485 (1951).

Privatdozent Dr. med. K. Mechelke,
Medizinische Univ.-Klinik Heidelberg, Bergheimerstr. 58.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 341—347 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

Die Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17β durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem *.

Von

F. Markwardt und K. Repke.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. Oktober 1954.)

In einer kürzlich erschienenen Übersicht über den Stoffwechsel der Steroidhormone stellen Dorfman u. Ungar (1953) fest, daß die Umwandlungen der Steroide im Organismus bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse auf Fermente zurückgeführt werden müssen. Zwar seien bereits einige Eigenschaften dieser Enzyme beschrieben, jedoch ist nach den genannten Autoren bislang kein eindeutig definiertes Steroidferment bekannt. — Wir haben dieses Problem an einem einfachen Beispiel, nämlich der fermentativen Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17 β[1], angegriffen. In einer vorangehenden Mitteilung (Repke u. Markwardt 1954b) konnten wir nach Versuchen mit roten Blutzellen die Beteiligung des Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystems an diesem Reduktionsprozeß als wahrscheinlich hinstellen. In der vorliegenden Arbeit werden die zur Sicherung dieses Ergebnisses angestellten Versuche mit dem isolierten System aus roten Blutzellen und Hefezellen beschrieben.

Methoden und Materialien.

Oestradiol-17β läßt sich von Oestron dadurch unterscheiden, daß es im Allen-Doisy-Test etwa 8—10mal stärker wirksam ist. Unser spezielles Vorgehen ist schon in früheren Mitteilungen beschrieben (Repke u. Markwardt, 1954a u. b). Dort finden sich auch Angaben über die Herstellung der Standardlösungen, über die Extraktion der Oestrogene aus den Ansätzen und über die Herkunft von Oestron, Oestradiol-17β und Glucose-6-phosphat. — Das „Zwischenferment" aus roten Blutzellen vom Meerschweinchen wurde nach der Vorschrift von Warburg u. Christian (1931) mit der Abweichung hergestellt, daß zwecks Begünstigung des Auskristallisierens von Hämoglobin statt der Wasser- die Gefrierhämolyse durchgeführt wurde. Bei den gleichen Autoren findet man auch die Vorschriften für die von uns benutzten Präparationen des Triphosphopyridinnucleotids (1931, 1932) und des „alten" gelben Ferments (1933). Das „Zwischenferment" aus Hefe wurde nach den älteren Angaben von Warburg u. Christian (1932) und nach der neueren Vorschrift derselben Autoren (1933) gewonnen. Die mit den beiden Verfahren hergestellten Präparate, welche unterschiedliche Ergebnisse brachten, werden im folgenden als Präparation I und II bezeichnet. Als Ausgangsmaterial für Präparation II wurde

* Herrn Prof. P. Wels zum 65. Geburtstag gewidmet.

[1] Nach der Nomenklatur von L. F. u. M. Fieser (1949).

statt Macerationssaft (aus untergäriger Bierhefe der Greifswalder Brauerei) auch Hefepreßsaft (aus Bäckerhefe) benutzt. Der Preßsaft wurde nach der Vorschrift von Harden u. Henley (1927) hergestellt. Die Aktivität aller genannten Präparate wurde entsprechend dem Vorgehen von Warburg u. Christian (1931, 1932, 1933) durch manometrische Bestimmungen gesichert. Bei den Hauptversuchen mit Oestron wurden den Ansätzen je 0,5 mg kristallinen Penicillins und Streptomycins zugesetzt, um das Wachstum von Bakterien zu hindern, die bekanntlich zur Umsetzung von Steroiden fähig sind.

Versuchsergebnisse.

I. „Zwischenferment" aus roten Blutzellen vom Meerschweinchen. Nach Inkubation von Oestron mit dem kompletten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem, bestehend aus „Zwischenferment" (von Meerschweinchen-Erythrocyten), Triphosphopyridinnucleotid und Glucose-6-phosphat, fanden wir bei der Auswertung im Allen-Doisy-Test eine gesteigerte oestrogene Wirksamkeit der Extrakte, welche die Bildung von Oestradiol-17 β anzeigte (vgl. Versuchsbeispiel 1 in Tab. 1). Allerdings wurde für die Umsetzung in der Regel eine verhältnismäßig lange Inkubationsdauer benötigt, obgleich sich alle benutzten Fermentpräparate bei der manometrischen Kontrolle in der Warburg-Apparatur als sehr aktiv erwiesen. Bemühungen, den limitierenden Faktor zu bestimmen, blieben erfolglos. Zusatz von Adenosintriphosphat (ATP) zu unseren Ansätzen hatten keinen Einfluß auf die Umsatzgeschwindigkeit. Auch die Angleichung des Redoxmilieus in den Fermentansätzen an die Verhältnisse in intakten roten Blutzellen war ohne Erfolg. Anstelle des intracellulären Glutathions haben wir dabei die Ansätze mit Cystein beschickt. Weiter blieb die Inkubation zusammen mit m/100 Cyanid ohne Einfluß. Dieser Zusatz wurde im Hinblick auf die Tatsache versucht, daß das „Zwischenferment" leicht durch Schwermetallspuren gehemmt wird und diese Hemmung durch Cyanid aufgehoben werden kann (v. Euler u. Adler, 1935). Letztlich mußten wir auch daran denken, daß bei der Präparation des „Zwischenferments" aus roten Blutzellen ein für das Zustandekommen der Oestronreduktion notwendiger Wasserstoffüberträger teilweise mit dem Hämoglobin oder dem Stroma entfernt sein konnte. Allerdings kam beim Zusatz eines derartigen Redoxkatalysators, nämlich von „altem" gelben Ferment, zu unseren Ansätzen keine Umsatzbeschleunigung zustande. Dennoch hat die obige Vermutung die größte Wahrscheinlichkeit für sich, zumal es sich bei unserem „Zwischenferment" aus roten Blutzellen nur um ein Rohpräparat handelte, bei dem sehr wohl noch kleine Mengen des in dem Ausgangsmaterial vermuteten Wasserstoffüberträgers enthalten sein konnten. Weitere Hinweise für die Beteiligung eines gelben Ferments an der Oestronreduktion wurden bei Versuchen mit „Zwischenferment" aus Hefezellen erhalten.

II. „Zwischenferment" aus Hefezellen. Schon 1934 haben H. v. Euler u. Zonder mitgeteilt, daß Oestron nach Inkubation mit Hefe eine gesteigerte oestrogene

Wirksamkeit zeigt. Da seinerzeit die Existenz eines wirksameren Derivats des Oestrons noch nicht bekannt war, erklärten sie diese Feststellung zunächst durch die Annahme, daß Hefe zur Neubildung des Hormons fähig sei. Viel später haben Zondek u. Sulman (1943) das Phänomen nochmals untersucht und jetzt auf die Bildung von Oestradiol-17β zurückgeführt. Inzwischen hatten Mamoli (1938) und Wettstein (1939) schon festgestellt, daß gärende Hefe aus zugesetztem Oestronacetat bzw. Oestron bei mehrtägiger Inkubation in guter Ausbeute Oestradiol-17β zu bilden imstande ist.

An diese Untersuchungen anknüpfend prüften wir vor den eigentlichen Versuchen mit dem isolierten Fermentsystem zunächst die Frage, ob tatsächlich die Gärung der Hefe für den untersuchten Vorgang von Bedeutung ist, wie das nach den Mitteilungen von Mamoli und Wettstein den Anschein hatte. Wir stellten fest, daß man die Gärung unterdrücken kann ohne gleichzeitig die Bildung von Oestradiol-17 β auszuschalten. In dem in Tab. 1 wiedergegebenen Versuchsbeispiel 2 wurde die (an der CO_2-Entwicklung gemessene) Gärung der intakten Hefe mit $2{,}5 \times 10^{-1}$ molarem, neutralisierten Cyanid vollständig, mit 20 mg ungereinigtem Bienengift zu 90% gehemmt. Trotzdem war bei der Auswertung dieser Ansätze im Allen-Doisy-Test eine ausgeprägte Aktivitätszunahme des eingewogenen Oestrons nachweisbar, welche die Reduktion zu Oestradiol-17 β anzeigte. — Weiter fanden wir, daß auch im Macerationssaft bei Gegenwart von Traubenzucker die Bildung von Oestradiol-17 β aus Oestron zustandekommt (vgl. Versuchsbeispiel 3). Die Tatsache, daß in diesem Fall Traubenzucker als Substrat genügte, brauchte uns übrigens nicht in der Annahme zu beirren, daß auch hierbei die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase die entscheidende Rolle spielt, denn Macerationssaft setzt Traubenzucker schnell zu Glucose-6-phosphat um (Neuberg u. Leibowitz, 1927). Bei einem Vergleich zwischen intakten Hefezellen und Macerationssaft fiel auf, daß auch bei gleicher Gärgeschwindigkeit die Oestronreduktion im Macerationssaft verzögert abläuft. Weiterhin war bei Verwendung von Macerationssaft die Umsetzung nicht mit der gleichen Sicherheit zu erhalten wie in den Ansätzen mit Hefezellen (über die vermutliche Ursache siehe unten).

Bei den anschließenden Versuchen mit dem isolierten Fermentsystem fanden wir in Ansätzen, die aus Präparation I des „Zwischenferment" (hergestellt aus Macerationssaft), Triphosphopyridinnucleotid und Glucose-6-phosphat bestanden, immer nur das eingewogene Oestron wieder. Die Aktivität dieser Ansätze hätte bei den gewählten Abmessungen, nach den manometrischen Kontrollen zu urteilen, bei weitem ausreichen müssen, um die eingesetzte Oestronmenge zu reduzieren. Unter der Annahme, daß dieses negative Ergebnis auf das Fehlen eines Wasserstoffüberträgers zurückgehen müsse, haben wir bei orientierenden Versuchen dem beschriebenen Ansatz Coenzym-Faktor oder „altes" gelbes Ferment zugesetzt, die jedoch ohne Einfluß auf die Versuchsresultate blieben.

Die gesuchte Umsetzung von Oestron zu Oestradiol-17 β durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem erhielten wir erst, als wir Präparation I gegen II austauschten (vgl. Versuchsbeispiel 3). Die beiden Präparationen unterscheiden sich vor allem dadurch, daß bei Präpara-

Tabelle 1.

Versuchsbeispiel	Ansatz	Eingewogene Oestrogendosis pro Tier γ	Prozentsatz oestrischer Tiere %
1	50 γ Oestron	0,75	24
	50 γ Oestron, 1 cm³ „Zwischenferment"-Lsg. aus Meerschweinchen-Erythrocyten, 2 cm³ TPN-Lsg., 0,5 cm³ 0,3 m Hexose-6-phosphat. Inkub.: 6 Std bei 37° C in Luft	0,75	70
	dt., Inkub.: 20 Std	0,75	92
	50 γ Oestradiol-17 β	0,75	85
2	30 γ Oestron	0,45	10
	30 γ Oestron, 2 cm³ Hefesuspension, 2 cm³ Wasser, 1 cm³ 50%ige Rohrzucker-Lsg. Inkub.: 5 Std bei 24° C in Luft	0,45	96
	dt., statt Wasser 2 cm³ m/1 Cyanid	0,45	48
	dt., statt Wasser 2 cm³ Bienengift-Lsg. (20 mg ungereinigtes Trockengift)	0,45	90
3	30 γ Oestron	0,45	8
	30 γ Oestron, 1 cm³ Macerationssaft, 0,5 cm³ 0,3 m Traubenzucker. Inkub.: 16 Std bei 37° C in Luft	0,45	98
	30 γ Oestron, 1 cm³ „Zwischenferment"-Lsg. (Präparation II aus Macerationssaft), 2 cm³ TPN-Lsg., 0,5 cm³ 0,3 m Traubenzucker. Inkub.: 16 Std bei 37° C in Luft	0,45	12
	dt., statt Traubenzucker 0,5 cm³ 0,3 m Hexose-6-phosphat	0,45	62
4	30 γ Oestron	0,45	14
	30 γ Oestron, 3 cm³ „Zwischenferment"-Lsg. (Präparation II aus Hefepreßsaft). 1 cm³ TPN-Lsg., 0,5 cm³ 0,3 m Traubenzucker. Inkub.: 13 Std bei 37° C in Luft	0,45	16
	dt., statt Traubenzucker 0,5 cm³ 0,3 m Hexose-6-phosphat	0,45	70
	30 γ Oestradiol-17 β	0,45	82
5	30 γ Oestron	0,45	10
	30 γ Oestron, 4 cm³ „Zwischenferment"-Lsg. (Präparation II aus Hefepreßsaft), 2 cm³ Wasser, 0,5 cm³ 0,3 m Hexose-6-phosphat. Inkub. 11 Std bei 37° C in Luft	0,45	2
	dt., statt Wasser 2 cm³ TPN-Lsg.	0,45	74

tion I 30° warmes Wasser, bei Präparation II dagegen Wasser von etwa 3° benutzt wird. Da die gelben Fermente teilweise recht instabil gegen Wärme sind (vgl. Haas u. Mitarb., 1940), nehmen wir an, daß die Unwirksamkeit der Präparation I durch Wärmeinaktivierung eines gelben Ferments zustandekommt, das in diesem „Zwischenferment"-Präparat mitenthalten ist.

Auch bei Verwendung der Präparation II aus Macerationssaft ließ sich die Oestronreduktion nicht regelmäßig erhalten und weiterhin verlief sogar mit den aktiven Präparaten die Umsetzung nicht immer quantitativ. Damit parallelgehend erhielten wir auch bei Inkubation mit Macerationssaft, dem Ausgangsmaterial der Präparation II, unregelmäßige Ergebnisse. Die Versuchsergebnisse schwankten vor allem dann stark, wenn wir für die Herstellung des Macerationssaftes ein neues Trockenhefepräparat herstellen mußten. Bei diesem unbefriedigenden Zustand erinnerten wir uns der Tatsache, daß gelbe Fermente wie der Coenzym-Faktor im Verlauf der Hefetrocknung, die der Bereitung des Macerationssaftes vorausgeht, zerstört werden können (vgl. Green u. Dewan, 1938). Im Hinblick auf diese Tatsache verwandten wir nun statt Macerationssaft Preßsaft als Ausgangsmaterial für Präparation II mit dem Erfolg, daß sich die Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17β durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem unabhängig von jeder Zufälligkeit reproduzieren ließ[1] (vgl. Versuchsbeispiel 4). Bei guten Fermentpräparaten wurde schon innerhalb 5 Std eine quantitative Umsetzung, beurteilt nach der Auswertung im Allen-Doisy-Test, erhalten. Das System Glucose-6-phosphat/6-Phosphogluconat gehört bekanntlich zu denjenigen, bei denen das Gleichgewicht ganz nach der Seite der Dehydrierung zu gelegen ist. Derartige Systeme können nur als Wasserstoffdonatoren, aber nicht als Wasserstoffacceptoren dienen. Das macht den offenbar quantitativen Verlauf der Oestronreduktion verständlich. — Anhangsweise ist zu bemerken, daß m/100 Monojodacetat oder m/100 Arsenit die fermentative Oestronreduktion nicht eindeutig hemmten. Man darf daraus schließen, daß bei dem untersuchten Prozeß offenbar Sulfhydrylgruppen keine Rolle spielen.

Die benutzten „Zwischenferment"-Präparate sind als Rohprodukte zu beurteilen. Die Schlüssigkeit der damit erhaltenen Ergebnisse wurde aber durch die Feststellung gesichert, daß bei Weglassen von TPN aus dem System (vgl. Versuchsbeispiel 5) oder bei Ersatz von Glucose-6-phosphat durch Glucose (vgl. Versuchsbeispiele 3 und 4) die untersuchte Umsetzung ausbleibt. — Die angeführten Versuchsresultate

[1] Die Benutzung von Preßsaft hat den Nachteil, daß die daraus bereitete Präparation II des „Zwischenferments" bei gewissen Hefesorten noch Spuren von Glucose-6-phosphat enthalten kann. Das gibt sich dann daran zu erkennen, daß auch ohne Substratzusatz die Oestronreduktion zustande kommt.

insgesamt legen die Schlußfolgerung nahe, daß für die Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17β die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zwar den Wasserstoff zu liefern vermag, daß jedoch Oestron erst durch Vermittlung eines im rohen „Zwischenferment" mitenthaltenen, einstweilen unbekannten Wasserstoffüberträgers den Wasserstoff aufnimmt.

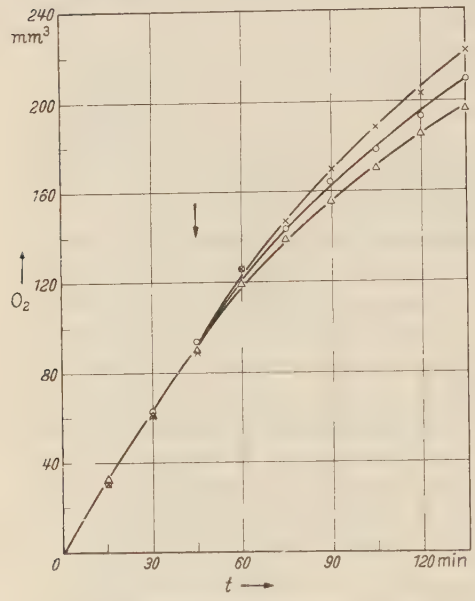


Abb. 1. Beeinflussung der Aktivität des Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystems durch Oestron und Oestradiol 17β. Manometrische Bestimmung in der Warburg-Apparatur: im Hauptraum 1 cm³ „Zwischenferment"-Lösung. (Präparation II aus Hefepreßsaft), 0,5 cm³ TPN-Lösung, 0,2 cm³ 0,3 m Hexose-6-phosphat, 0,2 cm³ 0,25% iges Methylenblau. Im Einsatz Kalilauge, im Gasraum Luft; in der Birne 0,3 cm³ 8% iges Humanalbumin (×—×), dt. mit 1 mg suspendiertem Oestron (o—o) oder mit 1 mg Oestradiol-17β (△—△). Beim Pfeil Einkippen der Birneninhalte.

Im Hinblick auf die gegenwärtige, lebhafte Diskussion über die Beeinflussung der Aktivität von Fermenten durch Hormone ist noch erwähnenswert, daß das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem durch Oestron und Oestradiol-17β geringfügig gehemmt wird (vgl. Abb. 1). Um möglichst viel Oestrogen in Lösung zu bekommen, wurde bei diesen Versuchen statt Wasser 10% iges Humanalbumin (Behringwerke) als Lösungsmittel benutzt (vgl. Bischoff u. Mitarb, 1953, und Eik-Nes u. Mitarb., 1954). Die stärkere Hemmwirkung des Oestradiol-17β gegenüber Oestron dürfte mit einer besseren Löslichkeit zusammenhängen.

Diskussion.

Die physiologische Bedeutung des Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystems ist noch nicht befriedigend geklärt. Trotz der weiten Verbreitung des Ferments — vor allem wurde es in Leber, Niere, Gehirn und Muskulatur nachgewiesen — ist bekanntlich die Oxydation von Glucose-6-phosphat gemessen am gesamten Umsatz an Glucose ein unbedeutender Nebenweg des Zuckerabbaus. Glock u. McLean (1954) weisen darauf hin, daß das System für die Ribosebildung wichtig ist, die auf diesem Wege eingeleitet wird. Die Beobachtungen von Ochoa u. Mitarb. (1948) legen eine Bedeutung des Fermentsystems für die CO_2-Fixation im tierischen Organismus nahe. Unsere Befunde lassen verallgemeinernd vermuten, daß das Ferment als Wasserstoffdonator für physiologische Reduktionen wichtig ist, welche ein stark negatives

Redoxpotential voraussetzen. Unter diesem Gesichtswinkel ist es denkbar, daß die Untauglichkeit der früher untersuchten Succinodehydrogenase und der wasserstoffübertragenden Fermente der Glykolyse und Gärung zur Oestronreduktion mit dem vergleichsweise positiveren Potential ihrer Redoxsysteme zusammenhängt. Die Redoxpotentiale (E'_0 in Volt) von einigen der in Frage kommenden Systeme werden bei p_H 7 folgendermaßen angegeben: Glucose-6-phosphat/6-Phosphogluconat —0,43, 3-Glycerinaldehyd-phosphat/1,3-Diphosphoglycerat —0,281 und Succinat/Fumarat 0,00 (Literatur bei Anderson u. Plaut, 1950).

Zusammenfassung.

In Fortsetzung einer früheren Untersuchung wird in der vorliegenden Mitteilung nachgewiesen, daß das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem von roten Blutzellen und Hefezellen zusammen mit einem noch unbekannten Wasserstoffüberträger Oestron zu Oestradiol-17β zu reduzieren vermag. Das Fermentsystem wird durch Oestron und Oestradiol-17β geringfügig in seiner Aktivität gehemmt.

Literatur.

Anderson, L., and G. W. E. Plaut: Table of oxidations-reduction potentials. In: Respiratory Enzymes, hrsg. von H. A. Lardy. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1950. — Bischoff, F., Ch. L. Gray and R. E. Katherman: Endocrinology (Springfield, Ill.) **53**, 321 (1953). — Dorfman, R. I., and F. Ungar: Metabolism of Steroid hormones. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1953. — Eik-Nes, K., J. A. Schellman, R. Lumry and L. T. Samuels: J. of Biol. Chem. **206**, 411 (1954). — Euler, H., v., u. E. Adler: Z. physiol. Chem. **232**, 10 (1935). — Euler, H., v., u. B. Zondek: Biochem. Z. **271**, 64 (1934). — Fieser, L. E., and M.: Natural products related to phenanthrene. New York: Reinhold Publishing Corp., 1949. — Glock, G. E., and P. McLean: Biochemic. J. **56**, 171 (1954). — Green, D. E., and J. G. Dewan: Biochemic. J. **32**, 1200 (1938). — Haas, E., B. L. Horecker and T. R. Hogness: J. of Biol. Chem. **136**, 747 (1940). — Harden, A., and F. R. Henley: Biochemic. J. **21**, 196 (1927). — Mamoli, L.: Ber. **71**, 2696 (1938). — Neuberg, C., u. J. Leibowitz: Biochem. Z. **184**, 489 (1927). — Ochoa, S., A. H. Mehler and A. Kornberg: J. of Biol. Chem. **174**, 979 (1948). — Repke, K., u. F. Markwardt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 259 (1954a) u. 271 (1954b). — Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **242**, 206 (1931); **254**, 438 (1932); **266**, 377 (1933). — Wettstein, A.: Helvet. chim. Acta **22**, 250 (1939). — Zondek, B., and F. Sulman: Endocrinology (Springfield, Ill.) **33**, 204 (1943).

Dr. F. Markwardt, Greifswald, Pharmakol. Inst. d. Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 348—356 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Herzwirkung und enterale Resorption des Thevetins*.

Von
MARTIN KRAMER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. November 1954.)

Anlaß der Untersuchungen waren günstige Berichte aus verschiedenen Kliniken über die therapeutische Verwendung des Thevetins (CÉLICE PLAS und JEANSON; CÉLICE, PLAS, LELUC, LECONTE des FLORIS und JEANSON; RICHARD; LIAN).

Das Glykosid stammt aus den Nüssen von Thevetia neriifolia JUSSIEU. Seine chemische Konstitution wurde von TSCHESCHE, TSCHESCHE u. BOHLE, endgültig von HELFENBERGER u. REICHSTEIN; BLINDENBACHER u. REICHSTEIN aufgeklärt. Danach ist das Aglykon des Thevetins Digitoxigenin. Am C_3 des Digitoxigenins ist der Thevetose genannte 2-Glucomethylose-3-methyläther und an diesem Zucker 2 Moleküle Glucose glykosidisch gebunden. Durch Abspalten des ersten Moleküls Glucose entsteht Thevebiosid und nach Abspalten des zweiten Neriifolin. Auch diese Glykoside sind herzwirksam (K. K. CHEN, ANDERSON u. HENDERSON, MEZEY). Neuerdings haben SCHENKER, HUNGER u. REICHSTEIN das Thevetin papierchromatographisch in 2 Fraktionen auftrennen können. Danach scheint es sich auch beim kristallinen Glykosid noch nicht um eine einheitliche Substanz zu handeln.

Nach K. K. CHEN u. AL. CHEN; CHEN, CHEN u. ANDERSON ist Thevetin etwa 8—9mal schwächer wirksam als g-Strophanthin und seine Wirkung hält nicht sehr lange an (HAAG u. PENNINGTON). Die Kumulation ist bisher nicht untersucht worden, ebenso nicht die enterale Resorption, die von den Klinikern verschieden beurteilt wird: Gut von MIDDLETON u. CHEN, DANIELS u. MIDDLETON, ferner einigen französischen Autoren; schlecht in einer Arbeit von GOLD et al. Von CHEN u. CHEN, ferner WALTON, LEARY u. JONES und von dem Kliniker GOLD u. Mitarb. wird über einen besonders raschen Wirkungseintritt des Thevetins berichtet. Dieser Effekt wurde von mir im Vergleich mit g-Strophanthin geprüft. Ferner war die von CHEN u. CHEN beschriebene darmerregende Wirkung von Interesse, da CÉLICE u. Mitarb. über eine besonders günstige Wirkung der Kombination mit Kationenaustauscherharzen berichtet haben, für deren Effekt nach DIETRICH, HERKEN u. WOLF die Verweildauer von besonderer Wichtigkeit ist.

Methodik.

1. Die Bestimmung der i.v. letalen Dosis nach HATCHER wurde an 7 Katzen beiderlei Geschlechtes im Gewicht zwischen 2,0 und 4,0 kg vorgenommen. Die zur Dauerinfusion benutzte Motorspritze hatte eine Auswurfmenge von 5 ml pro

* Ich danke der Firma Dr. Siegmund & Co, Berlin-Mariendorf, für die freundliche Überlassung von kristallinem Thevetin.

50 Minuten, in der die Dosis von 1 mg/kg Thevetin enthalten war. Somit wurde der Forderung von Haferkorn u. Lendle entsprechend, stets die gleiche Infusionsgeschwindigkeit in mg/kg/50 min eingehalten. Dies gilt auch für die übrigen Titrationen mit g-Strophanthin, bei denen die Infusionsgeschwindigkeit von 0,1 mg/kg/50 min gewählt wurde. Die Katzen wurden jeweils mit 1,25 g/kg Urethan i.p. narkotisiert, die V. jugularis präpariert, eine Trachealkanüle eingebunden und während der Infusion künstlich beatmet. Der Herzstillstand wurde mit einem Elektrokardiographen registriert. Die ungefähre LD 50 des Thevetins an Ratten wurde bei i.p. Injektion von 100, 200, 300 und 400 mg/kg ermittelt.

2. An 3 Katzen im Gewicht von 2,2—2,6 kg wurden orientierende Versuche über die Eliminationsgröße bei verschiedener Infusionsdauer durchgeführt.

3. Die Versuche zur oralen Wirksamkeit des Thevetins wurden an 13 Katzen beiderlei Geschlechtes im Gewicht von 2,0—4,5 kg und 1 Hund (6,8 kg) vorgenommen. Die ermittelte i.v. tödliche Dosis wurde in 5 cm^3 20%igen Alkohols gelöst, durch den Oesophagus in den Magen gespritzt und der Oesophagus unterhalb der Eröffnungsstelle abgebunden. Nach verschiedenen Zeiten wurde dann mit 0,1 mg/kg/50 min g-Strophanthin in der angegebenen Weise titriert, in einem Fall mit 1 mg/ g/50 min Thevetin. In einem weiteren wurde die doppelte i.v. tödliche Dosis in den Magen gegeben. Der Hund war wie die übrigen Hunde mit 40 mg/kg Pernocton i.v. narkotisiert worden, die Titrationsdosis betrug entsprechend den Angaben von Lendle 0,17 mg/kg/50 min g-Strophanthin[1].

4. Zur Bestimmung der Kumulation wurden 4 Katzen im Gewicht von 2,3 kg 5 Tage lang mit 0,1; 0,1; 0,1; 0,2 und 0,4 mg/kg Thevetin pro die subcutan vorbehandelt (insgesamt 90% der Hatcher-Dosis). Am 7. Tag wurde der Kumulationsrest mit 0,1 mg/kg/50 min Strophanthin titriert.

5. Gleichzeitige Registrierung des Herztones und der Pulswelle, ferner jeweils mit der II. Abteilung des EKGs wurde an 2 Hunden bei i.v. Dauerinfusion mit 0,5 mg/kg/50 min Thevetin und an einem Hund bei i.v. Dauerinfusion mit 0,05 mg/ g/50 min g-Strophanthin in verschiedenen Zeitabständen vorgenommen. Die Registrierung erfolgte mit einem Atlas-Doppel-Elektrokardiographen. Aus den gemessenen Größen wurde die Anspannungs- und Austreibungszeit einmal nach dem Verfahren von H. Maass und außerdem nach dem Vorschlag von A. Cerletti u. W. Weissel berechnet. Bei dem letzteren Verfahren wird die elektropressorische Latenz berücksichtigt. Beim ersten Hund betrug der Papiervorschub nur 4 cm/sec, der zu einer verläßlichen Auswertung nicht ausreichte. Der Versuch konnte deswegen nicht verwertet werden. Die Registrierung mit einem Papiervorschub von 10 cm/sec bei den anderen beiden Hunden ergab zuverlässige Werte.

6. Die Versuche an 2 isolierten Katzen- und 7 Kaninchenherzen wurden nach der Langendorff-Methode durchgeführt. Als Perfusionsflüssigkeit wurde eine O_2-gesättigte Ringer-Lösung benutzt.

7. Die Wirkung des Thevetins am Dünndarm in situ wurde an 6 mit 1,5 g/kg Urethan narkotisierten Kaninchen mittels der Trendelenburgschen „Schornsteinmethode" untersucht.

Ergebnisse.

1. Bestimmung der intravenös letalen Dosis.

Diese Untersuchung erschien notwendig, da die Angaben verschiedener Autoren differieren. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

[1] Benutzt wurde kristallines g-Strophanthin der Firma C. F. Boehringer mit einem Wassergehalt von 20,3%.

Die tödliche Dosis liegt im Durchschnitt bei 1,0 mg/kg bei der erheblichen mittleren Streuung von ±36% und dem mittleren Fehler von ±14%.

Tabelle 1. *Intravenös tödliche Dosis des Thevetins bei der Infusionsgeschwindigkeit von 1,0 mg/kg/50 min (Katzen).*

Nr.	Geschlecht	Gewicht in kg	Tödliche Dosis in mg/kg
1	♀	2,7	0,84
2	♂	4,0	0,96
3	♀	3,2	1,36
4	♀	1,9	0,94
5	♂	2,9	0,98
6	♂	4,2	1,59
7	♀	3,4	0,50
		Mittelwert	1,02
			$\sigma\pm$ 0,36
			$\varepsilon\pm$ 0,14

Bei 4 Katzen wurde nach verschiedenen Infusionszeiten eine Ekg aufgenommen. Dabei trat nur bei 2 Tieren eine vorübergehende und nicht erhebliche Bradykardie auf. Die von Célice, Lian und Richard beschriebene starke bradykardisierende Eigenschaft ließ sich im Tierversuch nicht beobachten. Die LD 50 des Thevetins an Ratten betrug bei intraperitonealer Applikation etwa 150 mg/kg. Zentralerregende Wirkungen traten nicht auf.

2. Enterale Resorption.

Vor der Bestimmung der enteralen Resorption wurden orientierende Versuche zur Beurteilung des Einflusses der Eliminationsgröße vorgenommen. Dabei wurden 3 Tieren verschiedene Dosen infundiert, so daß die Infusionszeit für 1 mg/kg 60, 100 und 200 min betrug. Das Ergebnis zeigt Tab. 2.

Tabelle 2. *Intravenös tödliche Dosis Thevetin bei verschiedenen Infusionszeiten.*

Nr.	Geschlecht	Gewicht in kg	Infundierte Dosis in mg/kg/50 min	exitus nach min	exitus nach sec	Tödliche Dosis in mg/k
1	♀	2,6	0,8	73	38	1,18
2	♀	2,4	0,5	110	03	1,10
3	♂	2,2	0,25	197		0,99

Aus dem vorliegenden Ergebnis, daß die tödliche Dosis bei der Infusionsdauer von 200 min von der mittleren tödlichen Dosis nach 50 min nicht abweicht — bei rascher Elimination müßte sie größer sein — kann man nur schließen, daß die Elimination bei den über höchstens 5½ Std sich erstreckenden Resorptionsversuchen wahrscheinlich keine große Rolle spielt.

Um über die Eliminationsgröße etwas aussagen zu können, wäre bei der erheblichen Streuung der Toxicität eine sehr viel größere Zahl von langdauernden Versuchen notwendig.

Das Ergebnis der Versuche der enteralen Resorption ist in Abb. 1 dargestellt. Nach 90—300 min war bei 8 Tieren einschließlich des Hundes, eine relativ konstante Resorption von 27—44% eingetreten. Die übrigen 6 Tiere zeigten keine oder eine wesentlich schlechtere Resorption. Bei der Ermittlung der Durchschnittswerte wurden die beiden Versuche nach 60 min nicht berücksichtigt. Andere Herzglykoside werden nach dieser Zeit ebenfalls noch nicht resorbiert (H. Reinert; K. Mezey). Die Resorption beträgt bei den verwerteten 11 Katzen $1\frac{1}{2}$—$5\frac{1}{2}$ Std nach der Applikation im Durchschnitt 23.7% ($\sigma = 16.5\%$, $\varepsilon = 5\%$). Bei einem Hund betrug die Resorption 33%.

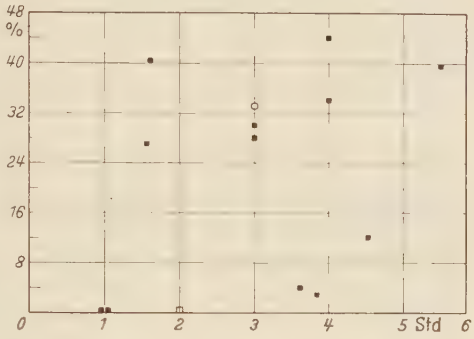


Abb. 1. Resorption des Thevetins vom Magen-Darm-Trakt. Zeichenerklärung: ▪ = Katze, i.v. Auffüllung mit g-Strophanthin; ‾ = Katze, i.v. Auffüllung mit Thevetin; o = Hund, i.v. Auffüllung mit g-Strophanthin. Ordinate: Differenz der MLD zur gebrauchten Dosis g-Strophanthin. Abszisse: Zeit in Stunden.

3. Kumulation.

Tab. 3 zeigt das Ergebnis der Kumulationsversuche.

Tabelle 3. *Kumulationsrest nach Vorbehandlung mit 0,9 mg/kg Thevetin subcutan.*

Nr.	Geschlecht	Gewicht in kg	Benötigte Dosis g-Strophanthin in mg/kg	Kumulationsrest in %
1	♀	2,3	0,054	51
2	♀	2,3	0,071	32
3	♀	2,3	0,052	53
4	♂	2,5	0,082	20
				D 39

Der durchschnittliche Kumulationsrest betrug am 7. Tag nach eintägigem Intervall 39%. Die Tiere zeigten nach der fünftägigen Vorbehandlung keine Beeinträchtigung der Freßlust.

4. Beeinflussung der Anspannungs- und Austreibungszeit durch Thevetin und g-Strophanthin am Hund.

Nach H. Sarre u. J. Meilinger kommt es unter der Wirkung von Herzglykosiden zu einer Zunahme der Austreibungszeit und Abnahme der Anspannungszeit bei gleicher Gesamtsystolendauer. Der Quotient Austreibungszeit/Anspannungszeit wird also größer. In meinen Versuchen bestätigten sich die Befunde von

Tabelle 4. *Einfluß von Thevetin und γ-Strophanthin auf die Anspannungs- und Austreibungszeit am Hund während i.v. Dauerinfusion.*

Glykosid	Tier kg	Infusion min	letal γ je kg	Dosis in v.H. der Li)	Austreibungszeit msec Anspannungszeit (1) msec	Anspannungszeit (2) (msec)	EPL*) (msec)	$Q_{(1)}$	$Q_{(2)}$
Strophanthin	♀ 19,4	165	165	normal	200/115	55	60	1,7	3,6
				18%	215/90	45	45	2,4	4,7
				30%	215/75	35	40	2,9	6,2
				61%	250/105	45	60	2,4	5,6
Thevetin	♂ 21,8	93	930	normal	120/110	60	50	1,1	2,0
				11%	135/105	60	45	1,3	2,3
				21%	140/87	40	47	1,6	3,5
				32%	130/102	48	52	1,3	2,7

(1) Anspannungszeit berechnet nach H. Maass = (Q bis Beginn der Pulswelle) minus (2. Herzton bis Pulswellenincisur).
(2) Anspannungszeit nach Cerletti u. Weissel = (Q bis Pulswellenanfang) minus (Q bis 1. Ton) minus (2. Ton bis Incisur).
* Q bis 1. Ton = EPL Elektropressorische Latenz.

Sarre u. Meilinger für Thevetin und Strophanthin (Tab. 4).

Verglichen wurden Werte der Anspannungs- und Austreibungszeit bei Dosen, die in Prozenten der tödlichen Dosis möglichst gleich waren.

Nach etwa 20% der letalen Dosis nahm Q_1 (Maass) beim Strophanthin um 41%, Q_2 um 30% zu, beim Thevetin um 45 und 75%. Nach den Untersuchungen von Cerletti u. Weissel dürfte es sicher sein, daß beim Auftreten der Q-Zacke noch kein Druckanstieg in der Kammer auftritt, sondern dieser mit dem Beginn des 1. Tones zusammenfällt. Interessant ist, daß Thevetin die elektropressorische Latenz (EPL), also den Abschnitt Q bis 1. Ton, weniger beeinflußt als g-Strophanthin.

Nach etwa 30% der letalen Dosis betrug beim Strophanthin die Zunahme von Q_1 71%, Q_2 72%, also mehr als bei der vorigen Dosis. Beim Thevetin betrug die Zunahme nur noch 18 und 35%, also weniger als vorher. Bei 45% der letalen Dosis war die Gesamtsystolendauer beim Thevetin verlängert und es zeigten sich im Ekg eine QRS-Verbreiterung und Extrasystolen. Das Verfahren der Anspannungs- und Austreibungszeit-Bestimmung von Maass gibt bei einer unregelmäßigen Herztätigkeit keine brauchbaren Werte. Beim Strophanthin zeigte das Ekg nach 61% der letalen Dosis außer einer geringen Abnahme der Pulsfrequenz noch keine Besonderheiten. Die Gesamtsystolendauer hatte zugenommen und die Quotienten waren kleiner geworden.

5. Thevetinwirkungen am isolierten Warmblüterherzen[1].

Sowohl am Kaninchen- als auch am Katzenherzen hatten

[1] Diese Untersuchungen wurden gemeinsam mit H. Kewitz durchgeführt.

50—300 γ Thevetin eine vorübergehende Verminderung des Coronardurchflusses zur Folge. Am geschädigten Herzen bewirkten gleiche Dosen eine Verstärkung der isotonischen Kontraktionen. Am Katzen- und Kaninchenherzen verstärkten 200—300 γ Thevetin die durch 1,0, 1,5 und 10 γ Acetylcholin bewirkte Durchflußminderung erheblich. 50 und 100 γ änderten die Coronarwirkung von 1 γ Acetylcholin nicht. Der nach Acetylcholin auftretende Herzstillstand wurde am Kaninchenherzen entweder nicht verändert, gelegentlich verstärkt und in einem Fall aufgehoben oder abgeschwächt.

6. Wirkung auf den Kaninchendünndarm in situ.

Durch 50—500 γ/kg Thevetin i.v. kam es zu einer verstärkten Peristaltik und Tonuserhöhung des Dünndarms. Die nach 0,2 mg/kg Thevetin verstärkte Peristaltik wurde bei 2 Tieren durch 0,2 mg/kg Atropin fast vollständig aufgehoben. Eine erneute Gabe von 0,2 mg/kg Thevetin war danach unwirksam. In den übrigen Versuchen wurde die Thevetinwirkung wenig oder gar nicht beeinflußt.

Diskussion.

Bei den Versuchen zur Ermittlung der i.v. tödlichen Dosis des Thevetins an der Katze fällt die sehr große Streuung auf. In der folgenden Tabelle sind einige Ergebnisse anderer Autoren zusammengestellt, die ebenso eine erhebliche Streuung erkennen lassen.

Tabelle 5. *Literaturangaben über die MLD des Thevetins an der Katze.*

Autor	Tödliche Dosis in mg/kg	Tierzahl	Streuung
K. K. Chen, Al. Chen	0,85	16	0,59—1,36
K. K. Chen, Anderson u. Henderson	0,89	26	$\pm$ 0,03
K. K. Chen, Anderson u. Henderson	1,0	5	$\pm$ 0,08
K. K. Chen, Al. Chen, Anderson	0,92	53	0,56—1,75
Haag u. Pennington	1,00	10	?
Gold u. Mitarb.	1,24	?	?

Die von Chen, Chen u. Anderson aus 53 Versuchen ermittelte Dosis von 0,92 mg/kg dürfte dem wirklichen Wert am nächsten kommen.

Auf Grund der hohen Streuung der tödlichen Dosis war bei den Versuchen zur enteralen Resorption, denen auch die Feststellung der tödlichen Dosis zugrunde gelegt wird, die gleiche Streuung zu erwarten. Die Resorption des Thevetins bei 11 Katzen hatte eine Streuung von σ $\pm$ 16,5% und einen mittleren Fehler von $\varepsilon = \pm$ 5%. Die Streuung ist kleiner als die der Hatcher-Dosis, was möglicherweise auf die größere Versuchszahl zurückzuführen ist. Die Ergebnisse berechtigen zu keinem Urteil über die *Regelmäßigkeit* der Resorption des Thevetins. H. Reinert

ermittelte an 11 Katzen 5 Std nach Applikation der MLD g-Strophanthin in den Magen einen Resorptionsgrad von 8,4%, der damit noch in der Fehlerbreite der Methodik liegt. J. Dörner fand an 13 Hunden eine Resorption des „Strophorals Boehringer" (10% Strophanthol + 90% g-Strophanthin) aus der Mundhöhle und dem Magen zwischen 2,5 und 9,1%, die ebenfalls noch in der Fehlerbreite der Methodik liegen dürfte. Die Resorption des Thevetins ist mit 23,7% besser als die des Strophanthins.

Der Kumulationsrest von 39% der Gesamtdosis von 0,9 mg/kg entspricht etwa der Größenordnung der Kumulation des k-Strophanthins. Bei einem Vergleich mit den Untersuchungen von L. Lendle ist zu berücksichtigen, daß ich den Kumulationsrest erst nach einem Intervall von 24 Std titriert habe. Außerdem waren in meinen Versuchen die Thevetindosen bei der Vorbehandlung nicht gleich, sondern die letzten Dosen größer als die ersten. Bei diesen Unterschieden in der Methodik kann man nicht sagen, ob Thevetin mehr oder weniger stark kumuliert als Strophanthin. Nach Versuchen an 8 Katzen von Haag und Pennington berechnet sich die Eliminationsgeschwindigkeit des Thevetins auf 0,026 mg/kg pro Stunde, das sind 2,6% der Hatcher-Dosis. Die Eliminationsgeschwindigkeit des g-Strophanthins bei i.v. Dauerinfusion beträgt nach Lendle 0,006 mg/kg/Std, also 6% der letalen Dosis. Danach würde das Thevetin nur halb so schnell eliminiert. Andererseits fanden Haag und Pennington an Tauben für das Thevetin eine wesentlich geringere Persistenz der Wirkung als Hatcher und Brody für das Ouabain.

Aus den Versuchen über die Beeinflussung der Anspannungs- und Austreibungszeit am Hund geht hervor, daß die Wirkung des Thevetins früher eintritt als die des g-Strophanthins. Walton, Leary und Jones fanden beim Vergleich der Steigerung der ventrikulären Kontraktionskraft durch verschiedene Herzglykoside, gemessen mit Hilfe eines am Herzen befestigten Dehnungsmeßstreifens („strain gauge"), beim Thevetin den raschesten Eintritt des Maximums. Allerdings war nur der Unterschied zum Digitoxin statistisch signifikant. Bei Sarre und Meilinger trat das Maximum der Änderung der Anspannungs- und Austreibungszeit am Menschen (gemessen nach Blumberger) nach 0,2 mg Strophanthin i.v. nach 5—15 min ein, bei Modell, Kwit, Dayrit, Shane, Zahm, Kramer und Gold das Maximum der Pulsverlangsamung nach 3 bis 6 Katzeneinheiten Thevetin i.v. nach 6 min.

Die Ergebnisse der Untersuchungen am Langendorff-Herzen sprechen für eine besonders starke Sensibilisierung der Coronarien durch Thevetin für die Acetylcholinwirkung. Möglicherweise ist auch die Darmwirkung auf einen ähnlichen Effekt an der glatten Muskulatur zurückzuführen, da sie in einigen Fällen in vivo durch Atropin aufgehoben wurde.

In vitro konnten Middleton und Chen die Darmerregung durch Atropinisierung nicht hemmen. Die günstigen Ergebnisse der Kombination mit Ionenaustauschern (Célice u. Mitarb.) sind wahrscheinlich auf die durch die Darmerregung abgekürzte Verweildauer und damit bessere Natriumbeladung der Austauscher zurückzuführen.

Thevetin ist ein Herzglykosid, welches wie das Strophanthin sehr rasch wirkt und wenig kumuliert. Es wird in einem gewissen Ausmaß enteral resorbiert.

Zusammenfassung.

Das Thevetin, ein herzwirksames Glykosid aus Thevetia neriifolia, wurde einer erneuten pharmakologischen Prüfung unterzogen. An 7 Katzen betrug die tödliche Dosis bei i.v. Dauerinfusion im Mittel 1,0 mg/kg, bei 2 Hunden 1,36 und 0,93 mg/kg. Von 1 mg/kg waren aus dem Magen von Katzen nach $1\frac{1}{2}$—$5\frac{1}{2}$ Std im Mittel 23,7% resorbiert. Bei 1 Hund ergab sich nach 3 Std eine Resorption aus dem Magen von 33%. Die Kumulationsneigung des Glykosids ist gering und entspricht bei Katzen etwa der des k-Strophanthins. Das Maximum der Herzwirkung, getestet an Veränderungen der Anspannungs und Austreibungszeit am Hund, tritt beim Thevetin schneller ein als beim Strophanthin. Am Langendorff-Herzen fiel eine Verstärkung der coronarverengenden Wirkung des Acetylcholins durch Thevetin auf. Es hat eine erregende Wirkung auf die Peristaltik des Dünndarmes.

Literatur.

Arnold, H. L., W. S. Middleton and K. K. Chen: The action of thevetin, a Cardiac Glucosid and its clinical application. Amer. J. Med. Sci. **189**, 193 (1935). — Blindenbacher, F., u. T. Reichstein: Synthese des L-Glucomethylose-3-methyläthers und seine Identifizierung mit Thevetose. Helvet. chim. Acta **31**, 1669 (1948). — Célice, J., F. Plas, R. Leluc, R. Leconte des Floris et F. Jeanson: Le traitment des insuffisances cardiaques par la Thévétine seule ou associée aux résines échangeuses de cations. Thérapie **8**, 189 (1953). — Célice, J., F. Plas et F. Jeanson: Un nouveau tonicardiaque la Thévétine. Expérimentation clinique sur 111 malades. Presse méd **1953**, 1207. — Chen, K. K., R. C. Anderson and F. G. Henderson: Comparison of the cardiac action of Neriifolin, Mono- and Diacetylneriifolin, un l Thevebiosid with Thevetin. Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 81 (1950). — Chen, K. K., and A. L. Chen: The action of crystalline Thevetin, a cardiac glucosid of Thevetia Neriifolia. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **51**, 23 (1934). — Chen, K. K., A. L. Chen and R. C. Anderson: The Potency of eleven crystalline cardiac principles from plants. J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **25**, 579 (1936). — Cerletti, A., u. W. Weissel: Zur Frage der elektromechanischen und elektropressorischen Latenz sowie der sogenannten Anspannungszeit des Herzens. Z. Kreislaufforsch. **41**, 241 (1952). — Daniels, E. R., and W. S. Middleton: Clinical experiences with reduced doses of Thevetin orally administered. Ann. Int. Med. **10**, 505 (1936). — Dietrich, H., H. Herken u. M. Wolf: Enterale Natrium- und Kaliumbeladung des Kationenaustauschers „Natrantit" bei verschiedener Verweildauer im Magen-Darmtrakt. Klin. Wschr. **1953**, 178. — Dörner,

J.: Experimentelle Untersuchungen zur oralen Wirksamkeit von Strophanthin (Strophoral), zugleich ein Beitrag zur Frage der Wirkungsweise toxischer Strophanthindosen. Z. Kreislaufforsch. **40**, 393 (1951). — Haag, H. B., and W. A. Pennington: The Persistence of effect of Thevetin. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **36**, 33 (1937). — Haferkorn, M., u. L. Lendle: Über die Abhängigkeit der Digitaliswirksamkeit von dem zeitlichen Ablauf der Herzbindung und der Verteilung auf extrakardiale Gewebe bei verschiedenen Injektionsweisen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 248 (1934). — Hatcher, R. A., and Brody L. G.: Amer. J. Pharmacy **82**, 360 (1910); zit. bei Haag, H. B., and W. A. Pennington: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **36**, 33 (1937). — Helfenberger, H., u. T. Reichstein: Thevetin I. Glykoside und Aglykone, 37. Mitt. Thevetin II. Glykoside und Aglykone, 39. Mitt. Helvet. chim. Acta **31**, 1470, 2097 (1948). — Lendle, L.: Über herzwirksame Glykoside. I. Mitt. Strophanthinelimination unter verschiedenen Bedingungen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 392 (1933). — Über die Eliminationsgeschwindigkeit und Kumulationsneigung von Digitalisglykosiden und Strophanthin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **180**, 518 (1936). — Digitaliskörper und verwandte herzwirksame Glykoside (Digitaloide). Handb. der experimentellen Pharmakologie Erg. Bd. I, S. 71 (1935). — Lian, C.: La Thévétine cristallisée dans le traitment de l'insuffisance cardiaque. Presse méd. **1952**, 1547. — Lian, C., et A. Kursat: Un nouveau médicament toni-cardiaque: La Thévétine cristallisée. Presse med. **1950**, 937. — Maass, H.: Über ein Verfahren zur Messung der Anspannungs- und Austreibungszeit beim Menschen. Z. Kreislaufforsch. **38**, 228 (1949). — Mezey, K.: Potency and pharmacological actions of Neriifolin, a Glycosid of Thevetia Neriifolia. Arch. internat. Pharmacodynamie **84**, 367 (1950). — Middleton, W. S., and K. K. Chen: Clinical results from oral administration of Thevetin, a cardiac glucoside. Amer. Heart J. **11**, 75 (1936). — Modell, W., N. T. Kwit, C. Dayrit, S. J. Shane, W. Zahm, M. L. Kramer and H. Gold: Studies on purified Digitalis Glycosides. VI. Thevetin, a Glycosid with unusual speed of Action in Man. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **94**, 44 (1948). — Reinert, H.: Die enterale Resorption des g-Strophanthins, k-Strophantols-γ und Digitoxins bei der Katze. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 1 (1952). — Richard, J.: Notes cliniques sur l'action de la Thévétine dans le traitment de l'insuffisance cardiaque. L'Hôpital Nr. 609, Avril 1952. — Richard, J.: Remarques à propos du traitment de l'insuffisance cardiaque par la Thévétine. J. Med. de Bordeaux **129**, Nr. 7 (1952). — Sarre, H., u. J. Meilinger: Vergleich der Wirkung von Strophanthin und Digilanid auf die Dynamik des insuffizienten Herzens. Dtsch. Arch. klin. Med. **188**, 258 (1941). — Schenker, E., A. Hunger u. T. Reichstein: Zur Papierchromatographie von stark polaren herzwirksamen Glykosiden und Aglykonen. Glykoside und Aglykone. 128. Mitt. Helvet. chim. Acta **37**, 680 (1954). — Tschesche, R.: Über pflanzliche Herzgifte, XI. Mitt.: Die Konstitution des Thevetins. Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 2368 (1936). — Tschesche, R., u. K. Bohle: Über pflanzliche Herzgifte, XII. Mitt.: Zur Stereochemie der Herzgift-Aglykone. Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 2443 (1936). — Walton, R. P., J. S. Leary and H. P. Jones: Comparative increase in ventricular contractile force produced by several cardiac Glycosides. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 346 (1950).

Dr. M. Kramer, Pharmakol. Institut d. Freien Universität,
Berlin-Dahlem, Thielallee 69/73.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 357—367 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst A. G.

Der Einfluß von Derivaten der Diphenylmethanreihe auf acetylcholinvermittelte Wirkungen.

Von

Ernst Lindner.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Juli 1954.)

Außer starken Analgeticis sind aus der Diphenylmethanreihe eine Anzahl Stoffe dargestellt worden[1], die keine analgetische Wirkung, sondern einen lähmenden Einfluß im Bereich des vegetativen Nervensystems und der Reizübertragung auf die willkürliche Muskulatur ausüben.

Das Piperidino-äthyl-diphenyl-acetamid (Tab. 1, Verbindung II) zeichnet sich durch starke atropinartige Eigenschaften aus.

Hierüber wurde zusammen mit O. Schaumann bereits berichtet. Am Carbaminoylcholinspasmus des Meerschweinchendickdarms in vitro und in vivo zeigte es sich etwa doppelt so stark spasmolytisch wirksam wie das Atropin. Die Peristaltik des normalen Rattendünndarms wurde dagegen nicht ganz so stark wie durch Atropin gehemmt. Bei der Ratte hemmte Verb. II die durch β-Methylcholinacetat stimulierte Tränensekretion in etwa gleicher Weise wie Atropin. In der Hemmung der mit Pilocarpin angeregten Speichelsekretion war es etwa doppelt so wirksam wie Atropin.

Methodik.

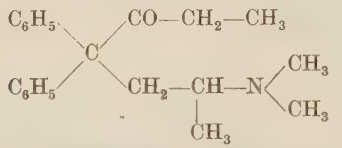
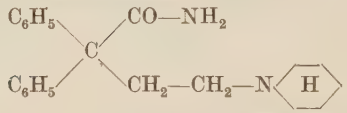
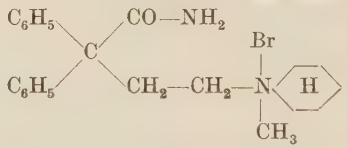
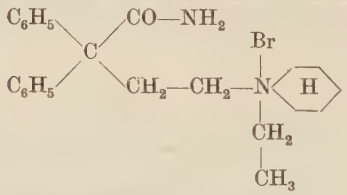
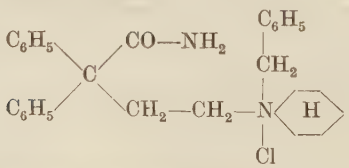
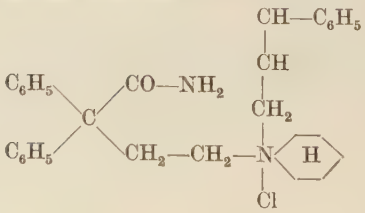
Die Untersuchungen am isolierten Meerschweinchendickdarm wurden nach der Methode von Magnus vorgenommen. Die Registrierung der Darmbewegungen am Meerschweinchendünndarm in situ erfolgte nach Takashi-Tojoma. Die Meerschweinchen wurden mit Urethan narkotisiert. Die Bewegungen des Hundedünndarms wurden mit Hilfe eines in den Darm eingeführten wassergefüllten Gummiballons und einem Wassermanometer registriert. Die Hunde erhielten eine Narkose mit Bromallyl-butylbarbitursäure (Pernocton). Außerdem wurde bei Hunden die Passage eines Bariumbreies durch den Magen röntgenologisch verfolgt. Die Entleerungszeit wurde erst in Kontrollversuchen, dann unter der Wirkung eines Pharmakons bestimmt. Weiterhin erfolgte bei Ratten nach der Methode von Brown u. Werner die Bestimmung der Wanderungsstrecke eines Cellulosekohlebreies im Dünndarm 30 min nach der Fütterung.

Die Wirkung auf die Salzsäuresekretion des Magens wurde nach der Methodik von Shay, Hawk u. Hundley bestimmt. An 36 Std hungernden, aber nicht durstenden Ratten wurde in Äthernarkose der Pylorus unter sorgfältiger Schonung der Gefäße unterbunden. Die Bauchdecke wurde durch Muskel- und Hautnaht wieder verschlossen. Sofort nach der Operation erhielten die Tiere 100 mg/kg

[1] Im pharmazeutisch-synthetischen Laboratorium unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ehrhart.

Cholin s.c. In jedem Versuch erhielten dann 10 Ratten das zu prüfende Präparat kurz vor der Cholininjektion i.m.; 5 dienten als Kontrollen. 2 Std später wurden die Tiere durch Äther getötet, der Magen herausgenommen und der Saft in ein Zentrifugengläschen gegossen. Mit Blut verunreinigte Magensäfte wurden verworfen. Nach kurzem Abzentrifugieren der etwa vorhandenen geringen Mengen feser Bestandteile wurde die Menge des Saftes aufgezeichnet und das p_H elektrometrisch bestimmt. Aus der Saftmenge und dem Numerus des p_H-Wertes wurde die absolute H-Ionenmenge für den Magensaft jeder Ratte berechnet. Für jede

Tabelle 1.

	Verbindung I „Polamidon" 1-Dimethylamino-4,4-diphenyl-heptanon. Chlorhydrat.
	Verbindung II Diphenyl-Piperidino-äthyl-acetamid. Chlorhydrat.
	Verbindung III Diphenyl-piperidino-äthyl-acetamid-brommethylat.
	Verbindung IV Diphenyl-piperidino-äthyl-acetamid-bromäthylat.
	Verbindung V Diphenyl-piperidinoäthyl-acetamid-chlorbenzylat.
	Verbindung VI Diphenyl-piperidinoäthyl-acetamid-chlorzinamylat.

Dosis des zu prüfenden Präparates wurden mindestens 20 Ratten verwendet. Dann wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert der Kontrollen und den Mittelwerten der mit den einzelnen Dosen injizierten Gruppen berechnet. Es wurde bestimmt, um wieviel Prozent die H-Ionenmenge im Vergleich zu den Kontrolltieren abgenommen hatte. Bei einer anderen Tiergruppe wurde zur Stimulierung der Salzsäuresekretion Insulin verwendet. Das Vorgehen war genau dasselbe, nur wurden an Stelle des Cholins 0,25 Einheiten Altinsulin s.c. gegeben. 15 min vor der Insulininjektion erhielten die Tiere das zu prüfende Präparat i.m.

Zur Prüfung der Wirksamkeit der Verbindungen gegenüber der Entstehung des experimentellen Magengeschwürs wurde nach Shay, Marotta u. Bovet vorgegangen. Bei 24 Std hungernden Ratten, denen aber Wasser zur Verfügung stand, wurde in Äthernarkose der Pylorus unterbunden. 24 Std später wurden die Tiere durch Äther getötet. Von den Kontrollen waren meist einige schon vorher an einer Magenperforation eingegangen. Die Mägen wurden herausgenommen, die aufgetretenen Geschwüre gezählt und die Perforationen verzeichnet. Beim einfachen Auszählen ergibt sich aber ein falsches Bild, da manche Mägen zahllose kleine Ulcera aufweisen, während andere eine großflächige Perforation oder mehrere große konfluierende Ulcera zeigen. Wenn man nur nach der Zahl der Geschwüre geht, so scheinen die Mägen mit zahlreichen stecknadelkopfgroßen Geschwüren einen schwereren Zustand zu zeigen, als die mit wenigen großen konfluierenden Geschwüren oder gar einer Perforation. Es wurde deshalb nicht die Dosis bestimmt, die die Zahl der Geschwüre auf die Hälfte vermindert, wie dies Cahen u. Toede tun, sondern die Dosis, die gerade jegliche Ulcusbildung unterdrückt.

Nach dem Vorgehen von Tripod wurde die nach Injektion von 1 mg/kg Pilocarpin i.v. abgesonderte Speichelmenge bei Kaninchen im Kontrollversuch und nach Verabreichung des zu prüfenden Präparates bestimmt.

Die Prüfung der ganglienblockierenden Wirkung erfolgte am oberen Halsganglion der Katze. Dazu wurde die Modifikation der Kibjakowschen Methode von Brücke benutzt. Die Injektionen erfolgten retrograd in die Carotis externa, während die Carotis communis für die Dauer der Injektion abgeklemmt wurde.

Zur Prüfung der indirekten Erregbarkeit der Muskulatur wurde an Kaninchen und Katzen der N. tibialis oder fibularis gereizt und die Wirkung auf die Beuger oder Strecker eines Hinterfußes registriert.

Die Gefäßwirkung wurde am Durchströmungspräparat der dekapitierten Ratte geprüft. Das Präparat wurde von der Bauchaorta her unter einem Druck von 35 mm Wasser im Langendorff-Apparat mit 37° warmer sauerstoffgesättigter Herz-Ringer-Lösung durchströmt.

Ergebnisse mit Verbindung III.

Macht man den Stickstoff im Piperidinring der Verbindung II quaternär (Tab. 1, Verbindung III), so kommt es zu einer Änderung des Wirkungscharakters. Chlor-, Jod- und Brommethylat gleichen sich in ihrer Wirkung völlig.

Wirkung auf Tonus und Peristaltik des Magen-Darmkanals. Während die parasympathicolytische Wirkung der Verbindung III am isolierten Meerschweinchendickdarm nur $^1/_3$ derjenigen des Atropins betrug, war sie am Meerschweinchendünndarm in situ gegenüber dem Carbaminoylcholinkrampf gleich wirksam wie Verbindung II, also doppelt so stark wie Atropin. Am Hundedarm in situ wirkte Verbindung III sowohl am unbeeinflußten, wie auch an dem durch Carbaminoylcholin spastisch

kontrahierten Dünndarm tonussenkend und peristaltikvermindernd (Tab. 2, Abb. 1). Auch in diesem Versuch waren Verbindung II und III gleichstark wirksam. 3—6 γ/kg i.v. hemmten die Wirkung von 3 und auch von 6 γ/kg Carbaminoylcholin i.v. Erst 30 min später war die Carbaminoylcholininjektion wieder wirksam.

Tabelle 2.

	Wirkung am:		
	isolierten Meerschweinchendickdarm gegen Carbaminoylcholin Vergleich m. Atropin=1	Hundedarm in situ. Hemmung der durch 2—3 γ/kg Carbaminoylcholin i.v. hervorgerufenen Tonussteigerung in γ/kg i.v.	Rattendünndarm in situ. Hemmung der Breipassage von 76% auf 44% durch = x γ/kg s.c.
Verbindung II	2	3—6	100
Verbindung III	$^1/_3$	3—6	100
Verbindung V	$^1/_6$	100	1000 (auf 55%)

	Verlängerung der Entleerungszeit des Hundemagens von 2 Std auf 4—5 Std durch x γ/kg s.c.	Salzsäuresekretion des Rattenmagens nach	
		Cholin	Insulin
		Reduktion auf 50% in γ/kg i.m.	
Verbindung II	300	130	
Verbindung III	300	16	19
Verbindung V	500	200	

	Hemmung der Ulcusbildung bei Ratten m. abgebundenem Pylorus durch x mg/kg s.c.	Hemmung der Pilocarpinspeichelsekretion bei Kaninchen durch x γ/kg s.c.	Hemmung der Tränensekretion nach β-Methylcholinacetat bei der Ratte mit x γ/kg s.c.
Verbindung II	2 × 20 nicht voll wirksam	100	300
Verbindung III	2 × 5	30	150
Verbindung V	2 × 30 unwirksam	5000	20000 nur Verminderung

30 min nach Fütterung eines Kohle-Cellulosebreies hatte der Brei bei 23 Kontrollratten 76,3% der Dünndarmlänge durchwandert. 20 Ratten, die vor der Breifütterung 0,1 mg/kg der Verbindung III s.c. erhalten hatten, zeigten aber nur eine Wanderungsstrecke von 43,8% der Dünndarmlänge, 20 Ratten, die 0,1 mg/kg Verbindung II erhalten

hatten eine Wanderungsstrecke von 44,2%. Auch in diesem Versuch waren also die Präparate gleich wirksam.

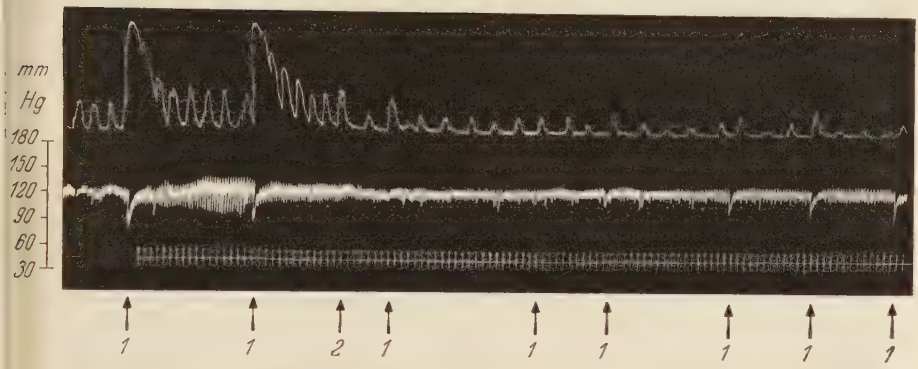


Abb. 1. Hund, 15 kg, Pernoktonnarkose. Obere Kurve: Tonus und Peristaltik des Dünndarms. Mittlere Kurve: Blutdruck. Untere Kurve: Zeit in Minuten. Bei 1 wurde jeweils 1 γ/kg Carbaminoylcholin i.v. injiziert, bei 2 3 γ/kg Verb. III.

Bei Breifütterung an Hunden war der Magen nach 2 Std entleert. Nach s.c. Injektion von 0,3 mg/kg der Verbindung II oder III enthielten die Mägen erst 4—5 Std nach der Fütterung keinen Brei mehr.

Wirkung auf die Salzsäuresekretion des Magens. Verbindung III verminderte bei Ratten die durch Cholin stimulierte Salzsäuresekretion erheblich. Mit 16 γ/kg i.m. wurde die Säuremenge gegenüber den Kontrollen um 50% vermindert. Verbindung II verminderte erst mit 130 γ/kg i.m. die Säuremenge um 50% (Abb. 2).

Auch die durch Insulin stimulierte Salzsäuresekretion wurde durch i.m. Injektion von 19 γ/kg der Verbindung III um 50% vermindert. Das Präparat ist also nicht nur gegenüber parasympathicomimetischen Stimulantien wirksam.

Bei 10 Ratten, deren Pylorus abgebunden war, verhinderte die Verbindung III mit 2 × 5 mg/kg s.c. im Abstand von 7 Std die Ulcusbildung völlig, während die 55 Kontrolltiere mit wenigen Ausnahmen schwere ulceröse Veränderungen der Magenwand zeigten. Manche Mägen

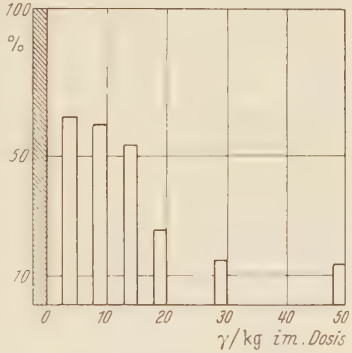


Abb. 2. Verhalten der Salzsäuremenge im Magensaft der Ratte nach Stimulierung der Sekretion mit 100 mg/kg Cholinchlorid s.c. und i.m. Injektion verschiedener Dosen Verb. III. Abszisse: Injizierte Dosis des Präparates III in Gamma pro kg. Ordinate: Sezernierte Salzsäuremenge in Prozent der von den Kontrollen sezernierten Salzsäuremenge. Zahl der Tiere: Kontrollen 86, mittlerer Fehler 13%. 1. Dosis 20, mittlerer Fehler 33%, 2. Dosis 23, mittlerer Fehler 28,2%, 3. Dosis 21, mittlerer Fehler 44,5%, 4. Dosis 21, mittlerer Fehler 35,2%, 5. Dosis 21, mittlerer Fehler 44,8%, 6. Dosis 21, mittlerer Fehler 36,5%.

wiesen bis zu 50 kleine Ulcera auf, andere wenige, aber großflächige Geschwüre, einige sogar eine oder mehrere Perforationen. Verbindung II hemmte dagegen die Geschwürsbildung selbst nach zweimaliger Injektion von 20 mg/kg s.c. nicht völlig. Bei 3 von 10 Tieren traten Geschwüre auf. Atropin verhinderte die Geschwürsbildung in einer Dosierung von 2×20 mg/kg s.c.

Die *Tränensekretion* der Ratte nach β-Methylcholinacetat wurde bereits durch 150 γ/kg der Verbindung III s.c. völlig gehemmt, während von Verbindung II und Atropin 300 γ/kg s.c. notwendig waren.

Speichelsekretion. 30 γ/kg Verbindung III s.c. hemmten gerade die durch 1 mg/kg Pilocarpin i.v. im Kontrollversuch abgesonderte Speichelsekretion völlig. Verbindung II tat dies erst mit 100 γ/kg s.c.

Herzfrequenz. Dimethylaminodiphenylheptanon führte beim Hund zu einer Vaguserregung, die sich in Speichelfluß, Kotabgang und Bradykardie äußerte. 10 γ/kg der Verbindung III s.c. reichten aus, um diese Erregung zu hemmen, während von Verbindung II 50 γ/kg s.c. nötig waren.

Während Atropin die *Pupille* der Katze bereits bei Einträufelung einer Lösung 1 : 20000 stark erweiterte, kam es nach Einbringung einer Lösung 1 : 10000 der Verbindung III nur zu einer mäßigen Pupillenerweiterung.

Ganglienblockierende Wirkung. Das obere Halsganglion der Katze blockierte Verbindung III gleich stark wie Tetraäthylammoniumbromid. Verbindung II wirkte dagegen nur halb so stark wie diese Vergleichssubstanz.

Verbindung III verminderte auch die Toxicität des Nicotins an der Maus. Nach i.v. Injektion von 2 mg/kg Nicotin starben 12 von 15 Mäusen. Nach Vorbehandlung mit 50 mg/kg Verbindung III s.c. starben nach i.v. Injektion von 2 mg/kg Nicotin von 15 Mäusen keine, nach i.v. Injektion von 3 mg/kg Nicotin von 20 Mäusen nur 7. Wurden die Mäuse aber mit 50 mg/kg Verbindung II s.c. vorbehandelt, so starben mit 2 mg/kg Nicotin i.v. 12 von 20 Mäusen.

Indirekte Erregbarkeit der Muskulatur. Nach i.v. Injektion von insgesamt 20 mg/kg Verbindung III im Laufe einer Stunde trat bei gleichbleibender Reizintensität eine Abnahme der Kontraktionshöhe um etwa 50% ein, die aber nur kurze Zeit anhielt. Weitere 15 mg/kg i.v. ließen die indirekte Erregbarkeit für kurze Zeit völlig erlöschen.

Kreislauf. Während Verbindung II zu Blutdruckanstieg führte, kam es nach i.v. Injektion der Verbindung III bei Hund, Katze und Kaninchen zu Blutdruckabfall. Zum Beispiel führte die i.v. Injektion von 1 mg/kg der Verbindung III bei einer mit Urethan narkotisierten Katze bei einem Ausgangsblutdruck von 120 mm Hg zu einem Blutdruckabfall um etwa 15 mm Hg. Nach 10 min war der Ausgangsblutdruck wieder erreicht.

Höhere Dosierungen wirkten entsprechend stärker. Am Kaninchenherzen nach LANGENDORFF kam es erst bei Infusion von 1 mg/min der Verbindung III nach einigen Minuten zu einer anfangs sehr geringen, nach halbstündiger Infusionsdauer etwas stärkeren Abnahme der Schlaggröße um etwa 25%. Die Frequenz nahm leicht ab. Auch der Coronardurchfluß verminderte sich um 10—40%. EKG-Veränderungen traten beim Hund nach i.v. Injektion von 3 × 5 mg/kg im Abstand von 10 min außer einer durch die Blutdrucksenkung bedingten Frequenzbeschleunigung nicht auf.

Toxicität. Die DL 50 der Verbindung III an der Maus betrug i.v. 13,5 mg/kg, s.c. 75 mg/kg, oral 800 mg/kg. Die Todesursache ist in einem Kollaps und in der Lähmung der Muskelendplatten zu sehen. Bei oraler Zuführung wird die Substanz weitgehend zerstört. Bei Ratten lag die DL 50 s.c. bei 350 mg/kg, beim Kaninchen i.v. bei 22,5 mg/kg. Die chronische Applikation von 15 mg/kg s.c. bei Ratten und von 10 mg/kg s.c. bei Hunden über 2 Monate führte zu keiner Schädigung der Organe[1].

Versuche mit Verbindung V (Chlorbenzylat):

Während das Bromäthylat (Verbindung IV) in seinen pharmakologischen Eigenschaften nicht nennenswert von Verbindung III abweicht, kommt es bei Verbindung V zu einer weiteren Zunahme der ganglienblockierenden und zu einer Abnahme der parasympathicolytischen Wirkung. In Tab. 2 sind einige Wirkungen des Präparates denen der Verbindungen II und III gegenübergestellt.

Die *ganglienblockierende Wirkung* war etwa dreimal stärker als die der Verbindung III oder des Tetraäthylammoniumbromids. Dementsprechend ließ sich eine Herabsetzung der Nicotintoxicität schon mit 20 mg/kg s.c. erreichen gegenüber 50 mg/kg der Verbindung III.

Kreislauf. Kleine Dosen des Präparates — 0,1 mg/kg i.v. beim Hund, 2—4 mg/kg i.v. bei der Katze — führten in Urethan- oder Bromallylbutylbarbitursäure-Narkose zu einem Blutdruckanstieg bis zu 60 mm. Oft kam es dann nach einigen Minuten zu einem Abfall des Druckes bis 40 mm unter den Ausgangswert. Höhere Dosen — 5 mg/kg und mehr — führten allerdings regelmäßig zu starken Drucksenkungen bis zu 60 mm.

Zunächst könnte man zur Erklärung dieser verschiedenen Wirkungen bei niederer und hoher Dosis annehmen, das Präparat besitze eine nicotinartige, erst erregende, dann lähmende Wirkung. Dann müßte aber am Halsganglion-Präparat, zumindest bei kleinen Dosen, eine Nickhautkontraktion zu sehen sein. Dies ist aber nicht der Fall. Dagegen zeigte sich, daß am Spinalkaninchen kleine und große Dosen (bis zu 15 mg/kg i.v.) zu einer langdauernden Drucksteigerung um 15 bis 20 mm Hg führten. Am Durchströmungspräparat riefen bereits 50 γ eine deutliche Gefäßverengerung hervor, während 1 mg stark verengend wirkte. Auch die Adrenalinwirkung wurde bei der Katze durch i.v. Injektion von 1 mg/kg der Verb. V

[1] Für die histologische Untersuchung bin ich Herrn Doz. Dr. BENOIT zu Dank verpflichtet.

verstärkt. Das Präparat ist also sein eigener Antagonist. Der direkt gefäßkontrahierenden Wirkung steht die indirekt erweiternde Wirkung durch Lähmung der sympathischen Ganglien gegenüber. Kleine Dosen, die zur Ganglienblockade noch nicht ausreichen, wirken daher blutdrucksteigernd, während bei hohen Dosen der durch die Lähmung der sympathischen Ganglien entstandene Tonusverlust der Gefäße durch die direkte constrictorische Wirkung nicht aufgewogen wird.

Die *Curarewirkung* der Verbindung V ist stärker als die der Verbindung III. 5 mg/kg i.v. blockierten die indirekte Erregbarkeit beim Kaninchen für wenige Minuten völlig. Bei der Katze, die ja auch gegenüber dem Tubocurarin weniger empfindlich ist, führten 5 mg/kg i.v. nur zu einer geringen, kurzdauernden Abschwächung der indirekten Erregbarkeit. Die kurze Dauer der Curarewirkung steht im Gegensatz zur langen Dauer der anderen Wirkungen.

Entsprechend der Stärke der Curarewirkung betrug die kleinste tödliche Dosis bei der Maus bei i.v. Injektion 5 mg/kg. Bei s.c. Injektion lag sie bei 80, bei oraler Gabe bei 400 mg/kg.

Zinamylat. Das Brom- oder Chlorzinamylat der Verbindung II, die Präparate VI und VII (Formel 6) zeigten einen weiteren Rückgang der parasympathicolytischen Wirkung gegenüber dem Lentinkrampf am isolierten Meerschweinchendickdarm. Die spasmolytische Wirkung betrug nur etwa $^1/_4$ derjenigen der Verbindung III. Die ganglienblockierende Wirkung am oberen Halsganglion der Katze war nicht deutlich stärker als die von III. Die nach Cholin eintretende Stimulierung der Salzsäuresekretion des Magens wurde durch VII erst mit 250 γ/kg i.m. zu 50% gehemmt.

Diammoniumbasen. Die Verknüpfung zweier Moleküle der Verbindung II am Stickstoff des Piperidinrings mittels einer Kette von $(\text{-}CH_2\text{-})_n$ kann bei geeigneter Länge dieser Kette zu einer bedeutenden Steigerung der curareartigen Wirksamkeit führen.

In Verb. VIII (Tab. 3) beträgt die Länge der die beiden quaternären Stickstoffatome verknüpfenden Kette 10 C-Atome, ein Abstand, der auch im Tubocurarin und zahlreichen synthetischen Curarestoffen vorliegt. Sie stellt offenbar in unserer Reihe das Optimum der Curarewirksamkeit dar.

Wie Loewe u. Harvey gezeigt haben, ist dieses Verhalten keineswegs als eine allgemein gültige Regel anzusehen. Nicht die Länge allein, sondern auch die Struktur der verbindenden Kette und ihre freie Drehbarkeit, wie auch die Struktur der am Stickstoff sitzenden Substituenten spielen eine Rolle bei der „Beschattung" des Receptors. In anderen chemischen Klassen haben wir dann auch die Erfahrung gemacht, daß eine Länge der Zwischenkette von 10 C-Atomen nicht das Optimum darstellte.

Bei der Taube führten 200 γ/kg Verbindung VIII i.v. gerade noch zum Tod durch Lähmung der Atemmuskulatur. Die Lähmung dauerte etwa $^1/_4$ Std an, wenn sie nicht tödlich wirkte. Sie war vom Tubocurarintyp, für den man eine Verdrängung des Acetylcholins vom Receptor der Muskelendplatte annimmt. d-Tubocurarinchlorid erwies sich im

Tabelle 3.

Formel			Atemlähmende Dos. a. d. Taube mg/kg i.v. Injektion	Muskellähmende Dos. am Kaninchen mg/kg i.v. Injektion	Atemlähmende Dos. a. d. Maus mg/kg i.v. Injektion	Muskellähmende Dos. a. d. Katze mg/kg i.v. Injektion
Verb. VIII						
ω,ω′-Dipiperidino-decamethylen-dibrom-bis-(3-amidocarboxy-3,3-diphenyl-propylat)	$R = (CH_2)_{10}$	Hal_2	0,2	0,1	2	0,8
Verb. IX						
ω,ω′-Dipiperidino-1,10-bis-methylen-carboxy-decamethylendichlor-bis-(3′-amidocarboxy-3′,3′-diphenylpropylat)	$R = CH_2\text{-}COO\text{-}(CH_2)_{10}\text{-}OOC\text{-}CH_2$		10 keine Atemlähmung	20 ohne Wirkg.	35	
Verb. X						
ω,ω′-Dipiperidino-p-xylolen-di-brom-bis-(3-amidocarboxy-3,3-diphenylpropylat)	$R = CH_2—C_6H_4—CH_2$		1	0,8	6	
Verb. XI						
ω,ω′-Dipiperidino-pentamethylen-dibrom-bis-(3-amidocarboxy-3,3-diphenyl-propylat)	$R = (CH_2)_5$		2	6	10	8
Verb. XII						
ω,ω′-Dipiperidino-trimethylen-di-brom-bis-(3-amidocarboxy-3,3-diphenylpropylat)	$R = (CH_2)_3$		10	10—15	20	
d-Tubo-Curarin-chlorid			0,2	0,1	0,15	0,4

Vergleich zu Verbindung VIII etwa gleich wirksam: 100 γ/kg i.v. wurden überlebt, während 200 γ/kg i.v. zum Tode führten. Beim Kaninchen in Pernoktonnarkose verminderten 100 γ/kg Verbindung VIII i.v. die indirekte Erregbarkeit der Strecker des linken Hinterbeines auf $^1/_3$. Die Atmung wurde bei dieser Dosis nicht gelähmt, der Blutdruck blieb unbeeinflußt. Etwa 10 min später war die normale indirekte Erregbarkeit wieder erreicht. Trotzdem bestand noch längere Zeit eine Empfindlichkeitssteigerung gegenüber der Curarewirkung. d-Tubocurarin führte in der gleichen Dosis zu einer gleich starken Verminderung der indirekten Erregbarkeit bei etwa gleicher Wirkungsdauer. Die Katze war sowohl gegen d-Tubocurarin, wie auch gegen Verbindung III weniger empfindlich. 400 γ/kg d-Tubocurarin i.v. verminderten die indirekte Erregbarkeit auf $^1/_4$. Verbindung VIII erwies sich an der Katze als nur halb so wirksam. Bei beiden Präparaten wurde künstliche Atmung notwendig. Während aber das Tubocurarin den Blutdruck recht erheblich senkte, führte Verbindung VIII zu einer mäßigen Drucksteigerung. Auch an der Maus war Verbindung VIII schwächer muskellähmend wirksam als Tubocurarin (siehe Tab. 3).

Die spasmolytische Wirkung gegenüber dem Carbaminoylcholinkrampf des isolierten Meerschweinchendickdarms ist auch in dieser Reihe der Di-ammonium-Verbindungen noch groß. So war Verbindung VIII noch 10—13mal so wirksam wie „Dolantin", Verbindung XI sogar 30mal.

Wie Tab. 3 zeigt, sinkt die Curarewirkung sowohl bei Verlängerung wie bei Verkürzung der die beiden Moleküle der Verbindung II verbindenden Kette.

Durch relativ geringfügige Veränderungen am Molekül gelang es so von analgetisch stark wirksamen Verbindungen zu hochwirksamen Parasympathicolytica und weiter zu einer in sehr geringer Menge antacid- und spasmolytisch wirkenden Verbindung zu kommen. Weiterhin gelangte man in dieser Reihe zu einer erheblich ganglienblockierenden Substanz und zu einem Stoff von ähnlich starker Wirkung wie Tubocurarin.

Zusammenfassung.

Diphenyl-piperidinoäthyl-acetamidbrommethylat mit quaternärem Stickstoffatom besitzt am isolierten Meerschweinchendickdarm nur $^1/_3$ der spasmolytischen Atropinwirkung, während der entsprechende Stoff mit tertiärem Stickstoff doppelt so wirksam ist wie Atropin. In vivo ist die spasmolytische Wirkung auf die glatte Muskulatur genau so stark wie bei der tertiären Verbindung. Ferner tritt bei der quaternären Verbindung eine ganglienblockierende Wirkung von der Stärke des Tetraäthylammoniumbromids auf, außerdem eine ausgeprägte Menge und Acidität des Magensaftes vermindernde Wirkung.

Das Diphenyl-piperidinoäthylacetatmidchlorbenzylat zeigte eine weitere Zunahme der ganglienblockierenden Wirkung auf das Dreifache derjenigen des Tetraäthylammoniumbromids bei Rückgang der parasympathocolytischen Wirkung.

Bei Verknüpfung zweier Moleküle des Diphenylpiperidinoäthylacetamid durch eine C_{10}-Kette zum Dipiperidino-decamethylendibrom-bis-(3-amidocarboxy-3,3-diphenylpropylat) steigt die Curarewirksamkeit sehr stark an, erreicht die des Tubocurarins und zeigt auch den gleichen Wirkungscharakter.

Literatur.

Brown, B. B., and H. W. Werner: J. of Pharmacol. **97**, 2, 157 (1949). — Brücke, F., W. Macho u. G. Werner: Wien. klin. Wschr. **1947**, 537. — Burgen, A. S. V.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 185 (1949). — Cahen, R. C., and C. M. Toede: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 3, 708 (1951). — Hawk, E. A., and J. M. Hundley: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 1, 318 (1951). — Loewe, S., a. S. C. Harvey: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 214 (1952). — Marotta, M., et D. Bovet: Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 2, 177 (1951). — Schaumann, O., u. E. Lindner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 93 (1951). — Shay, H., u. Mitarb.: Gastroenterology **5**, 43 (1945). — Tripod, J.: Helvet. physiol. Acta **7**, 135 (1949). — Winburg, M. M., D. M. Schmalgemeier and W. E. Hambourger: J. of Pharmacol **95**, 53 (1948).

Dr. E. Lindner, Pharmakologisches Laboratorium der Farbwerke Hoechst A.G., Frankfurt am Main-Höchst.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 368—377 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung und Fortbildung der Justus-Liebig-Hochschule Gießen, zur Zeit Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut (Direktor: Prof. Dr. F. Hildebrandt).

Die Beeinflussung der neurogenen Adrenalin- und Arterenoldilatation der Skeletmuskelgefäße durch Novocain, Atropin und Physostigmin, zugleich ein Beitrag zur Frage der Existenz vasodilatatorischer Nerven.

Von

J. Dörner und H.-J. Kuschke.

(Eingegangen am 9. November 1954.)

In vorausgegangenen Veröffentlichungen hat sich der eine von uns mit der Frage der Dilatation der Skeletmuskelgefäße nach intravenöser, intraaortaler und lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol befaßt (Dörner[1, 2, 3]). Es wurde dabei festgestellt, daß es nach intravenöser Injektion beider Substanzen zu einer primären Dilatation der Skeletmuskelgefäße kommt, die nur auf nervalem Wege ausgelöst sein kann. Wir konnten gleichzeitig eine Reihe von Befunden mitteilen, die dagegen sprachen, daß es sich bei dieser Dilatation um die Folge einer reflektorischen, zentralen oder ganglionären Hemmung des Sympathicotonus handelt. Damit rückte die Frage einer Beteiligung vasodilatatorischer Nerven in den Vordergrund. Die in vorliegender Arbeit mitgeteilten Versuche wurden daher mit dem Ziel unternommen, um 1. zu klären, ob die zur Diskussion stehende Dilatation durch Hemmung des Sympathicotonus oder unter Beteiligung vasodilatatorischer Nerven zustande kommt, 2. bei entsprechenden Ergebnissen zur Frage der Natur solcher vasodilatatorischer Nerven Stellung nehmen zu können.

Methodik.

Die Versuche wurden an 27 Hunden im durchschnittlichen Gewicht von 12 bis 15 kg durchgeführt. Narkose: 4 mg/kg Morphin i.m., ½ Std später 0,5 cm³ kg Pernocton* i.m.

Durchblutungsmessung der Skeletmuskulatur beider Hinterextremitäten an den Vv. fem. mit der Diathermie-Thermostromuhr nach Rein. Die Hautäste waren unterbunden und die Pfoten oberhalb der Ferse fest umschnürt. Es kamen nur Elemente vom Typ A und N zur Anwendung, die die notwendigen Voraussetzungen zur Feststellung relativer Durchströmungsänderungen besaßen (Dörner 4).

* Pernocton: 10%ige wäßrige Lösung des Natriumsalzes der β-bromallyl-sek.-butylbarbitursäure.

Blutdruckmessung mit photoelektrischem Transmissionsmanometer nach Rein in einer A. brachialis. Alle Versuche wurden bei normalen Blutdruckverhältnissen durchgeführt. Rectaltemperatur 37—39°. Dauer der Versuche im Höchstfall 10 bis 11 Std von Beginn der Narkose an gerechnet.

Die Hunde atmeten spontan. Eine Hemmung des Sympathicotonus wurde durch Hyperventilation hervorgerufen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere einige Minuten vor der beabsichtigten Reaktion mit Atempumpe beatmet und die Hyperventilation durch Erhöhung des Atemhubs und der Atemfrequenz herbeigeführt. Die Hyperventilation wurde beendet durch Umstellung der Tiere auf Spontanatmung. Dauer der Hyperventilation 2 min. Die primäre Dilatation der Skeletmuskelgefäße wurde durch i.v. Injektion von 0,3—1,0 γ/kg l-Arterenol ausgelöst. Arterenol wurde anstatt Adrenalin aus den an anderer Stelle (Dörner 3) wiedergegebenen Gründen gewählt. Die mit Arterenol erhaltenen Ergebnisse gelten jedoch in gleicher Weise auch für Adrenalin. Beeinflussung dieser sowie der durch Hyperventilation hervorgerufenen Dilatation durch vorherige intraarterielle Injektion von Novocain, Atropin oder Physostigmin. Diese Substanzen wurden durch Kanülen, die unterhalb des Leistenbandes in einen Seitenast beider A. fem. eingebunden worden waren, direkt in die A. fem. injiziert. Die Dosierungen sind aus den Tabellen zu entnehmen.

Ergebnisse.

1. Die Beeinflussung der neurogenen Arterenoldilatation durch Novocain.

Die nach intravenöser Injektion von Arterenol in den Blutgefäßen der Hinterextremitätenmuskulatur auftretende Mehrdurchblutung als Ausdruck einer Gefäßdilatation wird durch vorhergehende lokale intraarterielle Novocaininjektion (Injektionsgeschwindigkeit 2—3 min) entweder ganz aufgehoben oder stark abgeschwächt. Dies geht aus sämtlichen Versuchen der Tab. 1 hervor. Durchschnittlich 3,5 min nach der Novocaininjektion beträgt die Durchblutungszunahme im Mittel nur noch etwa 30% der vor Novocain vorhandenen Durchströmungszunahme. Nach durchschnittlich 26 min ist die Mehrdurchblutung wieder stärker, ohne jedoch in den meisten Fällen den Ausgangswert zu erreichen (vorletzte Spalte der Tab. 1).

Da bei Injektion in eine A. fem. ein Teil des Novocains in den allgemeinen Kreislauf und damit auch in die andere Hinterextremität gelangt, muß auch dort die durch Arterenol hervorgerufene Durchblutungsreaktion beeinflußt werden, wenn auch schwächer im Vergleich zu den Ergebnissen der Tab. 1. Dies ist der Fall, wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist. Im Mittel beträgt die Durchblutungszunahme nach vorausgegangener Novocaininjektion in die gegenseitige A. fem. noch etwa 59% gegenüber vorher.

Aus den Unterschieden der Tab. 1 und 2 kann gefolgert werden, daß die starke Abschwächung der Arterenolreaktion in der Extremität, in die das Novocain direkt injiziert wird, einer lokalen Novocainwirkung zuzuschreiben ist. Novocain selbst führt bei intraarterieller Injektion zu einer Gefäßdilatation, die vielfach schon während der Injektion wieder nachläßt, um meist einige Minuten nach der Injektion verschwunden zu sein.

Tabelle 1. *Maximale Durchblutungszunahme der Hinterextremität (nur Muskulatur) in Prozent der Ausgangsdurchblutung nach intravenöser Injektion von Arterenol vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Novocain in die gleichseitige A. femoralis.*

Vers. Nr.	i. v. Arterenoldosis in γ/kg	Vor Novocain		Nach Novocain				Novocaindosis pro kg
		Zunahme in %	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	
7	0,5		50	1,5	0	18	42	2 mg
	0,5		49	1,0	13	10	40	2 mg
	0,5		44	1,0	9			2 mg
9	0,5		225	4,0	95			2 mg
12	1,0	13	18	3,0	0	20	3	5 mg
13	0,5	39	58	4,0	25	28	36	2 mg
	0,5		36	5,0	8	27	45	5 mg
15	0,5	21	36	4,0	8	27	27	2 mg
	0,5		27	6,5	6	31	20	5 mg
16	0,5	128	82	4,5	56	33	43	5 mg
17	0,5		73	4,0	10	26	46	5 mg
18	0,5	62	68	4,5	25	30	57	5 mg
19	0,5	74	66	2,5	17	36	43	2 mg
21	0,3		54	5,0	20	18	34	5 mg
23	0,5	32	32	2,5	3	28	0	2 mg
26	0,5	43	28	3,0	6	34	29	2 mg
27	0,5	80	55	3,0	7	29	43	1,8 mg
Im Mittel:		55,8	58,9	3,5	18,1	26,3	33,9	

Wir mußten deshalb mit den Arterenolinjektionen warten, bis die Novocainreaktion abgeklungen war. Gelangt das Novocain in den allgemeinen Kreislauf und die gegenseitige Extremität, so kommt es auch hier zu einer allerdings schwächeren vorübergehenden Gefäßdilatation.

2. Die Beeinflussung der durch Hyperventilation ausgelösten Gefäßdilatation durch Novocain.

Eine Senkung des Sympathicotonus kann durch Hyperventilation hervorgerufen werden. Die in unseren Versuchen dabei auftretende Mehrdurchblutung in der Hinterextremitätenmuskulatur ist etwas schwächer als die Mehrdurchblutung nach Arterenolinjektion (Tab. 3 und 4). Berücksichtigt man dagegen den starken Blutdruckabfall bei Hyperventilation, so ist in unseren Versuchen die Gefäßdilatation nach Hyperventilation im Durchschnitt stärker als nach den intravenösen Arterenolinjektionen. Tab. 3 zeigt nun, daß die hyperventilationsbedingte Mehrdurch-

Tabelle 2. *Maximale Durchblutungszunahme der Hinterextremität (nur Muskulatur) in Prozent der Ausgangsdurchblutung nach intravenöser Injektion von Arterenol vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Novocain in die gegenseitige A. femoralis.*

Vers. Nr.	i.v. Arterenoldosis in γ/kg	Vor Novocain		Nach Novocain				Novocaindosis pro kg
		Zunahme in %	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	
7	0,5		49	1,5	25	18	49	2 mg
	0,5		42	1,0	60	10	44	2 mg
12	1,0	0	18	3,0	0	20	0	5 mg
13	0,5	49	86	4,0	137	28	63	2 mg
	0,5	137	63	5,0	25	27	68	5 mg
16	0,5	173	62	4,5	38	33	90	5 mg
17	0,5		65	4,0	16	26	0	5 mg
18	0,5	43	230	4,5	42	30	116	5 mg
19	0,5	50	44	2,5	13	36	38	2 g m
21	0,3		110	5,0	83	18	90	5 mg
23	0,5		41	2,5	10	29	33	2 mg
24	0,5	25	30	5,5	19	25	25	5 mg
26	0,5	21	2	3,0	3	33	16	2 mg
27	0,5	90	68	3,0	65	29	63	1,8 mg
Im Mittel:		65,3	65	3,5	38,3	25,9	49,3	

blutung in einem Teil der Fälle überhaupt nicht und teilweise nur schwach oder nicht sicher durch vorhergehende intraarterielle Novocaininjektionen beeinflußt wird. Die Novocaindosen sind die gleichen wie in Tab. 1 und 2. Nach Novocain beträgt die Durchblutungszunahme im Durchschnitt noch 78% der Zunahme vor Novocain (beim Arterenol sind es nur 30%). Die Blutdruckänderungen werden durch diese Novocaininjektionen nicht beeinflußt. Während die Arterenolmehrdurchblutung ohne Ausnahme durch Novocain abgeschwächt wird, ist dies bei der Durchströmungszunahme während Hyperventilation nicht der Fall. Darüberhinaus zeigt Tab. 4, daß die Mehrdurchblutung während Hyperventilation in der gegenseitigen A. fem. durch Novocain im Durchschnitt keine Minderung erfährt, während dies beim Arterenol der Fall ist (Tab. 2).

3. Die Beeinflussung der neurogenen Arterenoldilatation durch Atropin und Physostigmin.

Auf Grund vorstehender Ergebnisse ist die Beteiligung vasodilatatorischer Fasern beim Zustandekommen der neurogenen Arterenoldila-

tation zu folgern. Es war daher naheliegend, die Wirkung lokaler intraarterieller Atropin- und Physostigmininjektionen auf die arterenolbedingte Durchblutungszunahme der Skeletmuskulatur zu untersuchen.

Tabelle 3. *Maximale Durchblutungszunahme der Hinterextremität (nur Muskulatur) in Prozent der Ausgangsdurchblutung während Hyperventilation von 2 min Dauer vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Novocain in die gleichseitige A. femoralis.*

Vers. Nr.	Vor Novocain		Nach Novocain				Novocain-dosis pro kg
	Zunahme in %	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	
10	25	36	3,0	35			2 mg
		35	4,0	34			5 mg
13		95	4,0	97			5 mg
18		41	5,0	39	28	47	5 mg
19	43	37	3,0	33	32	71	2 mg
	29	40	2,5	32	24	33	2 mg
21	101	96	4,5	68	33	100	5 mg
22	50	54	1,5	17	27	27	2 mg
23	22	15	3,0	9	34	18	2 mg
	22	29	3,0	21	32	19	2 mg
24	7	36	3,0	30			1,5 mg
25	55	50	3,5	44	27	44	2 mg
26	37	33	2,0	14	22	17	2 mg
27	163	177	3,0	126	27	91	2 mg
Im Mittel:	50,4	55,3	3,2	41,4	28,6	46,7	

Tab. 5 zeigt, daß nach gleichseitiger intraarterieller Atropininjektion die Durchblutungsreaktion im Vergleich zu vorher recht unterschiedlich ausfallen kann. Die Mehrdurchblutung ist abgeschwächt bis aufgehoben, verstärkt oder unverändert. Das gleiche Bild ergibt sich aus einer Beurteilung der Durchblutung in der gegenseitigen Hinterextremität, weswegen wir auf eine Wiedergabe dieser Ergebnisse verzichten.

Nicht anders sind die Befunde bei Anwendung von Physostigmin (Tab. 6). Auch hier wird die Durchströmungszunahme nur in einem Teil der Versuche durch Physostigmin verstärkt, teilweise bleibt sie dagegen unverändert oder wird abgeschwächt. Normale Schwankungen der Durchblutungsreaktion sind bei Anwendung beider Pharmaka selbstverständlich mit zu berücksichtigen.

Tabelle 4. *Maximale Durchblutungszunahme der Hinterextremität (nur Muskulatur) in Prozent der Ausgangsdurchblutung während Hyperventilation von 2 min Dauer vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Novocain in die gegenseitige A. femoralis.*

Vers. Nr.	Vor Novocain		Nach Novocain				Novocain-dosis pro kg
	Zunahme in %	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	
10	23	31	3,0	57			2 mg
	31	57	4,0	32			5 mg
13		56	4,0	56			5 mg
18		45	4,0	27			5 mg
19	36	21	3,0	72	32	93	2 mg
	30	37	2,5	40	24	32	2 mg
21	45	38	4,5	38	33	47	5 mg
22	40	31	1,5	54	27	59	2 mg
23	14	28	3,0	22	34	29	2 mg
		18	3,0	10	32	19	2 mg
24	11	12	3,0	19	32	19	5 mg
	19	19	3,5	26	30	56	5 mg
25	43	48	3,5	46	27	38	2 mg
26	25	40	3,0	43	24	43	2 mg
27	145	178	3,0	111	27	47	2 mg
Im Mittel:	38,5	43,9	3,3	43,5	29,3	43,8	

Tabelle 5. *Maximale Durchblutungszunahme der Hinterextremität (nur Muskulatur) in Prozent der Ausgangsdurchblutung nach intravenöser Injektion von Arterenol vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Atropin in die gleichseitige A. femoralis.*

Vers. Nr.	i. v. Arterenoldosis in γ/kg	Vor Atropin		Nach Atropin				Atropindosis in γ/kg
		Zunahme in %	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	
1	1,0		82	8	24	23	8	3
2	1,0		77	11	170	59	80	12
3	1,0		53	7	25			5
7	0,5	35	21	15	26	58	40	Dauerinf. 11/min 23′ lang
9	0,5		117	16	120	69	95	Dauerinf. 10/min 26′ lang
21	0,3		45	4	42			10
22	0,5	35	20	7	0			20
26	0,5	0	8	9	0			50
27	0,5	42	16	10	80	29	55	100

Tabelle 6. *Maximale Durchblutungszunahme der Hinterextremität (nur Muskulatur) in Prozent der Ausgangsdurchblutung nach intravenöser Injektion von Arterenol vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Physostigmin in die gleichseitige A. femoralis.*

Vers. Nr.	i.v. Arterenoldosis in γ/kg	Vor Physostigmin		Nach Physostigmin				Physostigmindosis in γ/kg
		Zunahme in %	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	Zeit in min	Zunahme in %	
1	1,0		61	5	130	33	82	10
	1,0		63	10	200	36	47	10
2	1,0		33	10	71	30	77	10
	1,0		70	18	110	41	55	10
3	1,0	105	64	15	88	29	53	10
4			57	4	25			10
5	0,5	136	44	3	28			10
21	0,5	76	50	3	65	20	61	10
	0,3		50	4,5	46	20	63	20
	0,3		56	3	49			10
22	0,5	27	19	3	23	21	20	5
23	0,5	57	62	9	17	39	41	10
25	0,5	0	0	4,5	31	20	0	10
26	0,5	3	16	6	0	41	0	10
	0,5	17	14	5	4			10
27	0,5	34	60	6	31			10

Besprechung der Ergebnisse.

In einer vorhergehenden Arbeit (Dörner 2) haben wir eine Reihe von Befunden zusammengestellt, die dagegen sprechen, daß die auf nervalem Wege ausgelöste Dilatation der Skeletmuskelgefäße nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol auf eine Hemmung des Sympathicotonus, sei sie reflektorischer, zentraler oder ganglionärer Natur, zurückzuführen ist. Mit den in vorliegender Arbeit wiedergegebenen Befunden, wonach die zur Diskussion stehende Dilatation durch lokale Novocaininjektionen immer stark abgeschwächt bis aufgehoben werden kann, die durch Hyperventilation ausgelöste Gefäßdilatation aber nicht oder nur wesentlich schwächer, glauben wir gezeigt zu haben, daß beide Gefäßdilatationen ursächlich nicht durch denselben Mechanismus hervorgerufen sein können. Das heißt, die neurogene Adrenalin- und Arterenoldilatation kann nicht auf dem Wege über eine Senkung des Sympathicotonus zustandekommen derart, daß sie mit einer verminderten Freisetzung von Adrenalin oder Arterenol an den sympathischen Nervendigungen verbunden ist, wie dies bei der hyperventilationsbedingten und

jeder anderen Senkung des Sympathicotonus der Fall ist, die mit einer verminderten Impulsaussendung im sympathischen System einhergeht. Es spielt dabei keine Rolle, ob eine solche Tonussenkung reflektorisch, zentral oder ganglionär bedingt ist, der Endeffekt ist derselbe: an den sympathischen Nervendigungen wird der chemische Überträgerstoff in vermindertem Maße in Freiheit gesetzt. Letzterer Mechanismus als Ursache der neurogenen Adrenalin- und Arterenoldilatation wäre auch wenig sinnvoll, da die verminderte Freisetzung beider Substanzen als Folge der erwähnten Hemmung des Sympathicotonus durch die gleichzeitige Zufuhr von Adrenalin oder Arterenol auf dem Blutwege mehr oder weniger kompensiert oder überkompensiert würde.

Der erwähnte Mechanismus einer Senkung des Sympathicotonus ist nicht der einzige. Die zweite Möglichkeit, den Tonus im sympathischen System zu vermindern, besteht darin, daß die in normaler Menge an den sympathischen Nervendigungen freigesetzten Überträgerstoffe an der Effektorzelle nicht mehr oder nicht mehr voll zur Wirkung gelangen. Dies ist der Fall bei Blockierung der Angriffspunkte der sympathischen Überträgerstoffe an der Effektorzelle durch chemische Substanzen, wie z. B. Dibenamin. Auch hier kommt es zu einer Senkung des Sympathicotonus, die aber von der zuerst erwähnten Möglichkeit prinzipiell verschieden ist. In Anlehnung an SCHAEFER wollen wir daher von einer *nervalen* und *cellulären* Senkung des Sympathicotonus sprechen.

Betrachtet man es als erwiesen, daß die primäre Adrenalin- und Arterenoldilatation auf nervalem Wege ausgelöst wird (DÖRNER 1, 2), und erkennt man fernerhin an, daß sie nicht über eine nervale Hemmung des Sympathicotonus zustande kommt, so bleibt auf Grund unserer heutigen Kenntnisse nur die Möglichkeit einer Beteiligung vasodilatatorischer Nerven.

Der Begriff vasodilatatorischer Nerven ist dabei nicht, wie das häufig geschieht, von vornherein gleichzusetzen damit, daß bei Reizung solcher Nerven in der Peripherie eine Substanz frei wird, die von sich aus eine aktive Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. Solche Fasern können in gleicher Weise eine Wirkung entfalten unter Vermittlung einer Substanz, die Adrenalin und Arterenol an der Effectorzelle nicht mehr wirksam werden läßt, also im Sinne einer cellulären Senkung des Sympathicotonus wirkt. Letztere Möglichkeit halten wir für die wahrscheinlichere, da sie unseren Vorstellungen über die antagonistische Wirkung von Pharmaka an der Zellstruktur eher entspricht. Daß hierbei zunächst an das Acetylcholin gedacht werden muß, darauf haben wir schon an anderer Stelle hingewiesen (DÖRNER 2). Acetylcholin verhindert die constrictorischen Adrenalin- und Arterenolwirkungen.

Aus unseren Versuchen mit Atropin und Physostigmin geht nun nicht mit genügender Deutlichkeit hervor, daß es cholinergische Fasern sind, welche die Dilatation unter Freisetzung von Acetylcholin vermitteln. Andererseits kann aus diesen Befunden auch nicht gefolgert werden, daß

es keine cholinergischen Nerven sind, da bekannt ist, daß nicht alle Wirkungen derartiger Nerven durch Atropin aufgehoben werden. So muß die Natur der die Erregung übertragenden Fasern weiterhin offengelassen werden.

Auch die mit dieser Frage in Zusammenhang stehenden Literaturergebnisse lassen keine weitere Klärung zu. So fanden Maltesos u. Schneider, Folkow u. Uvnäs, Keyssler u. Schmier und Bülbring u. Burn, daß die bei Grenzstrangreizung in der Hinterextremität auftretende Gefäßdilatation durch Eserin verstärkt bzw. durch Atropin aufgehoben wird. Folkow u. Uvnäs berichten allerdings auch, daß Atropin nach Dibenaminvorbehandlung die periphere Vasodilatation nicht vollständig unterdrücken kann. Das gleiche ergibt sich aus Versuchen von Rosenblueth u. Cannon. Bei Reizung des N. lingualis wurde die in den Zungengefäßen entstehende Mehrdurchblutung durch Atropinisierung nicht aufgehoben (Maltesos u. Schneider; Erici, Folkow u. Uvnäs), obwohl nach letzteren Autoren in den aus der Vene entnommenen Proben Acetylcholin nachgewiesen werden konnte. Die depressorische Adrenalinwirkung, die als Ausdruck der neurogenen Adrenalindilatation zu werten ist, kann durch Atropinisierung (Boxill u. Brown; Chen u. Russell; Hildebrand; Krause; Rosenblueth u. Cannon) und Eserinisierung (Rosenblueth u. Cannon; Binet u. Burstein) nicht beeinflußt werden.

Zusammenfassung.

In Versuchen an 27 Hunden in Morphin-Pernoctonnarkose wurde zu der Frage Stellung genommen, ob die neurogene Adrenalin- und Arterenoldilatation der Skeletmuskelgefäße durch ein Nachlassen des Tonus im sympathischen Nervensystem oder unter Beteiligung vasodilatatorischer Nerven zustandekommt. Durch die verschiedene Beeinflussung der neurogenen Arterenoldilatation und der durch Hyperventilation hervorgerufenen Dilatation durch intraarterielle Novocaininjektionen konnte gezeigt werden, daß die zur Diskussion stehende Dilatation nicht einer nervalen Hemmung des Sympathicotonus zuzuschreiben und damit die Beteiligung vasodilatatorischer Fasern zu folgern ist. Die Natur dieser Fasern muß offengelassen werden, da die weiteren Versuche mit intraarterieller Atropin- und Physostigminvorbehandlung nicht mit genügender Deutlichkeit zeigten, daß es sich dabei um cholinergische Nerven handelt. Auf die Unterscheidung zwischen nervaler und cellulärer Senkung des Sympathicotonus und die Möglichkeit einer Wirkung vasodilatatorischer Nerven über letzteren Modus wurde hingewiesen.

Literatur.

Binet, L., et M. Burstein: Sur la vasodilatation périphérique d'origine adrénalinique. C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 630 (1947). — Boxill, G. C., and R. V. Brown: Epinephrine Prepotency Over Pressoreceptor Responses Elicited by Elevated Blood Pressure. Amer. J. Physiol. **172**, 385 (1953). — Bülbring, E., and J. H. Burn: The sympathetic dilator fibres in the muscles of the cat and dog. J. of Physiol. **83**, 483 (1935). — Chen, G., and D. Russell: Influence of diphenhydramine on blood pressure response to epinephrine in the dog under adrenergic blockade. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 298 (1950). - Dörner, J.

(1): Zur Ursache der primären Mehrdurchblutung der Skeletmuskulatur nach Injektion von Adrenalin und Arterenol. Pflügers Arch. **257**, 464 (1953). — Dörner, J. (2): Ist die auf nervalem Wege ausgelöste Gefäßdilatation nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol die Folge einer Hemmung des Sympathicotonus? Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 273 (1954). — Dörner, J. (3): Zur Frage der Gefäßdilatation nach Adrenalin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 286 (1954). — Dörner, J. (4): Beitrag zur Frage einer quantitativen Durchströmungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach H. Rein. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 312 (1954). — Erici, J., B. Folkow and B. Uvnäs: Sympathetic Vasodilator Nerves to the Tongue of the Cat. Acta physiol. scand. (Stockh.) **25**, 1 (1952). — Folkow, B., and B. Uvnäs: Do Adrenergic Vasodilator Nerves Exist? Acta physiol. scand. (Stockh.) **20**, 329 (1950). — Hildebrand, G.: Zur Analogie zwischen depressorischer Adrenalinwirkung und Adrenalinumkehr. Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 269 (1953). — Keyssler, H., u. J. Schmier: Reaktionen der peripheren Durchblutung nach Entnervung. Pflügers Arch. **253**, 301 (1951). — Krause, D.: Über den Mechanismus der depressorischen Adrenalinwirkung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 145 (1950/51). — Maltesos, C., u. M. Schneider: Über Reizversuche an Vasodilatatoren. Pflügers Arch. **241**, 120 (1939). — Rosenblueth, A., and W. B. Cannon: The chemical mediation of sympathetic vasodilator nerve impulses. Amer. J. Physiol. **112**, 33 (1935). — Schaefer, H.: Grundprobleme der vegetativen tonischen Innervation. Acta neurovegetativa (Wien) **4**, 201 (1952).

Dozent Dr. med. J. Dörner,
z. Z. Harvard Medical School, Dept. of Pharmacol. Boston, Mass.
Dr. med. H.-J. Kuschke, Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 378—383 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie der Justus-Liebig-Hochschule Gießen, z. Zt. Bad Nauheim Kerckhoff-Institut (Direktor: Prof. Dr. F. Hildebrandt).

Polarisationsoptische Untersuchung zur Frage morphologischer Veränderungen an der Markscheide peripherer Nerven durch Novocain*.

Von

Hans-Jürgen Kuschke und Mutgard Kuschke.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 26. November 1954.)

Versuche, die Wirkungsweise der Lokalanaesthetica aufzuklären, sind von verschiedenen methodischen Seiten her unternommen worden. Nach dem heutigen Stand der Forschung ist die Grundlage der anaesthetischen Wirkung am Nerven in physikalisch-chemischen Veränderungen an den erregungsleitenden Substraten, wie Störungen an Grenzflächen und Fermentfunktionen, zu sehen. Während die wesentlichsten Kenntnisse vorwiegend funktionell ausgerichteten Forschungsmethoden zu danken sind, wurden auch von morphologischer Seite her Beiträge zu dem Problem geliefert.

So fand Donaggio mit normalmikroskopischer Methode, daß nach der Einwirkung von 0,5%iger Novocain- oder 0,1%iger Percainlösung auf freigelegte Nerven bei Kaninchen Veränderungen auftreten, die er mit einer von ihm entwickelten histologischen Färbung nachweist. Nach der Färbung hält der mit dem Lokalanaestheticum behandelte Nerv bei der anschließenden Differenzierung (Entfärbung) die Farbe etwas fester als der unbehandelte der Gegenseite. Die Veränderungen, von ihm als initiale primäre Degeneration bezeichnet, sollen parallel mit der Anaesthesie des Nerven auftreten und wieder verschwinden. Sie finden sich zuerst am Achsenzylinder und greifen dann auf die Markscheide über unter Bildung kompakter Massen und Tropfen. Daß die Veränderungen zuerst am Achsenzylinder auftreten, steht mit den elektrophysiologischen Befunden von Tasaki und von Kato in Einklang, wonach die Nervenfaser besonders am Ranvierschen Schnürring der Einwirkung von Narkotica zugänglich ist. In letzter Zeit haben Glaninger und Burian den N. ischiadicus des Kaninchens zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lokalanaesthesie mit üblichen histologischen Färbemethoden untersucht. Sie beschreiben nach Anaesthesie mit 1%iger Novocainlösung nach 20 min ödematöse Verquellung und stellenweise undeutliche Färbung der Markscheide und nach 4 Std stärkere Veränderungen mit dichter Vacuolenbildung in der Markscheide, 4 Wochen nach der Anaesthesie ist der Befund wieder normal. Die Autoren deuten die Veränderungen als funktionelle Anomalie des Nerven auf pharmakodynamischer Basis.

* Herrn Prof. W. J. Schmidt, Direktor emer. des Zoologischen Instituts Gießen, aus Anlaß seines 70. Geburtstages gewidmet.

In gewissem Gegensatz zu diesen Befunden steht die Ansicht v. Muralts, daß bei der distalen Degeneration alle morphologisch nachweisbaren Veränderungen erst dann auftreten, wenn die Erregbarkeit der Faser längst verloren gegangen ist. Dagegen fand er am N. ischiadicus des Meerschweinchens bei der distalen Degeneration schon wenige Stunden nach der operativen Durchtrennung des Nerven, bevor gewöhnlich die Erregbarkeit verloren geht, eine Änderung der Doppelbrechung.

Den färberischen Methoden haftet der Nachteil an, daß bei der Fixation, Einbettung und Färbung das untersuchte Gewebe erheblichen Eingriffen unterworfen wird, die alleine schon Veränderungen an der Struktur hervorrufen können, wie z. B. die Alkoholbehandlung der Schnitte, deren lipoidlösende Wirkung auf die Markscheide durch die Formolfixation nicht völlig verhindert werden kann (W. J. Schmidt). Auch Kontrollpräparate von unbehandeltem Gewebe vermögen nicht immer mit Sicherheit zur Unterscheidung zu verhelfen, welche Veränderungen von der untersuchten Einwirkung herrühren und welche bei der Herstellung des Präparates aufgetreten sind, da die Unterschiede gering sein können und dann der Subjektivität des Beurteilers unterworfen sind.

Die polarisationsoptische Methode dagegen gestattet anisotropes Gewebe in frischem Zustand zu untersuchen. Doppelbrechung ist stets Auswirkung und Kennzeichen eines geordneten Feinbaues, wobei es sich um Ordnung von Atomen, Molekeln oder Molekelkomplexen handeln kann. So müssen Veränderungen in der Ordnung der Feinbausteine als Änderung der Doppelbrechung sichtbar und meßbar werden. Am peripheren Nerven ist die Markscheide einer solchen Untersuchung zugänglich. Wie die polarisationsoptische und röntgenographische Forschung ergeben hat, sind die Bausteine der Markscheide, Lipoide und Proteine, abwechselnd in zylindrischer Schichtung angeordnet. Dabei stehen die Lipoidmolekeln mit ihrer Längsachse radiär zur Faserachse, während die Eiweißbestandteile zirkulär orientiert sind. Da das Myelin selbst positiv einachsig doppelbrechend in bezug auf den Radius der Markscheide ist, ergibt sich für die gesamte Faser in Längsansicht eine negative Doppelbrechung in bezug auf die Länge (W. J. Schmidt).

Angaben über die Wirkung lipoidlöslicher Stoffe auf die Doppelbrechung der Markscheide finden sich bei W. J. Schmidt. So ruft schon 30%iger Alkohol eine tropfige Entmischung in lipoide und nicht lipoide Anteile und schließlich Lösung des Lipoids hervor. Die Doppelbrechung sinkt bis zum Verschwinden. Aus der Gruppe der lokalanaesthetisch wirksamen Stoffe ist anscheinend nur Cocain untersucht worden. Spiegel fand an Einzelfasern des Rattenischiadicus keine Änderung der Anisotropie durch anaesthetisch wirksame Dosen bei Prüfung mit der Gipsplatte Rot I. Bei röntgenographischer Analyse fand Boehm bei Amylalkoholeinwirkung Verbreiterung der von der Markscheide herrührenden Punkte im Diagramm zu Kreissegmenten als Ausdruck der Anreicherung des lipoidlöslichen Narkoticums in der Markscheide. Cocain-HCl erzeugte auch hier keine Veränderungen, trotz völliger Anaesthesie des Nerven.

Da nach den Befunden von Donaggio sowie Glaninger u. Burian nach Applikation des cocainverwandten Novocain die Markscheide

Zeichen stärkerer struktureller Veränderungen aufwies, haben wir die Frage einer Bearbeitung mit der polarisationsoptischen Methode unterzogen. Es war also zu klären, ob bei der Anaesthesie des peripheren Nerven am Säugetier in der unserer Methode zugänglichen Markscheide strukturelle Veränderungen auftreten.

Methodik.

Wir legten an Meerschweinchen in Urethannarkose den N. ischiadicus frei, applizierten 0,25 cm³ einer 1—5%igen Novocainlösung in physiol. Kochsalzlösung perineural und excidierten den Nerven nach 30 min, 1, 2, 4 und 12 Std. Aus dem excidierten Nerven wurde ein einzelnes Stämmchen unter der binokularen Lupe isoliert, die bindegewebigen Hüllen entfernt und die Einzelfasern vorsichtig auseinander gezogen. Die polarisationsoptischen Messungen wurden mit dem Mikroskop Biopol und dem Berek-Kompensator der Firma E. Leitz durchgeführt. Da der zu messende Gangunterschied in Abhängigkeit zur Faserdicke steht und mit zunehmender Dicke ansteigt, wurden die Einzelfasern in 3 Stärkegruppen von 3—6 μ, von 7—10 μ und von 11—13 μ Durchmesser eingeteilt und in jeder Gruppe bei 10 Fasern die Stärke des Gangunterschiedes mit dem Berek-Kompensator gemessen. Da bei normalen Fasern der Gangunterschied sich mit dem Achsenabstand ändert und sein Maximum zwischen mittlerem und innerem Drittel der Markscheidenbreite hat, wurde stets dieser maximale Gangunterschied bestimmt, d. h. es wurde bis zur völligen Schwärzung der Markscheide kompensiert. Bei der Messung war darauf zu achten, daß nur solche Fasern gemessen wurden, die durch die Präparation nicht beschädigt worden waren. Normale Fasern veränderten innerhalb 1 Std ihre Anisotropie nicht. Die Messungen an einem Präparat waren in 30—40 min durchzuführen.

Ergebnisse.

Zunächst wurden unbehandelte Fasern von 10 Tieren untersucht. Die Durchschnittswerte der bei 10 Fasern bestimmten Gangunterschiede zeigten in jeder Dickengruppe von Tier zu Tier gute Übereinstimmung. Die Mittelwerte aller 100 gemessenen Fasern betrugen bei den dünnen 28,7 mμ, bei den mittleren 47,8 mμ und bei den dicken 74,4 mμ.

Die mit 1%iger Novocainlösung behandelten Nerven zeigten an keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Gangunterschied der Einzelfasern, der von den Werten bei unbehandelten Tieren abwich. Auch bei Steigerung der Novocaindosis bis auf 5% ergab sich kein Unterschied.

Daraufhin untersuchten wir die Wirkung des Novocains auf die isolierte Einzelfaser des frischen, unbehandelten Nerven bei direkter Einwirkung. Hierzu wurde eine Einzelfaser zunächst in physiolog. Kochsalzlösung unter dem Deckglas gemessen, sodann Novocainlösung mittels Filterpapier durchgesaugt und 30 min lang Veränderungen des Gangunterschieds und des Aussehens der Faser verfolgt. Untersucht wurden Novocainkonzentrationen von 1, 2, 3, 4 und 5% in physiol. Kochsalzlösung an jeweils 5 Präparaten. Bei den Konzentrationen 1 und 2% waren auch hier keine Veränderungen an den Nervenfasern zu beobachten. Erst bei 3% kam es zur Senkung der Doppelbrechung. Die

Struktur der Fasern war dabei im allgemeinen erhalten, jedoch fand sich teilweise eine leichte Quellung der Faser und ein Verschwinden der zylindro-konischen Segmente. Bei 4% war die Doppelbrechung stärker gesenkt (Tab. 1). An strukturellen Veränderungen bestand häufiger eine Quellung, die zylindro-konischen Segmente waren stets verschwunden und gelegentlich fand sich ein gleichmäßiges Auslöschen der Markscheide, was als Degenerationszeichen anzusehen ist. Bei Steigerung der Novocainkonzentration auf 5% traten weitere, als Auflösungserscheinungen anzusehende Befunde hinzu, insbesondere kam es regelmäßig zu Myelinaustritten, gewöhnlich unter Bildung sogenannter Sphäritenkreuze als Zeichen radiärer oder tangentialer Anordnung der ausgetretenen Myelinbestandteile (Abb. 1). Die Veränderungen setzten wenige Minuten nach Beginn der Novocaineinwirkung ein. Ein genauer Zeitabschnitt für die Latenz läßt sich nicht angeben, da das Auswechseln der Lösungen unter dem Deckglas eine gewisse Zeit in Anspruch nahm. Die Veränderungen waren nicht reversibel: sie blieben bestehen, nachdem die Novocainlösung wieder durch physiol. Kochsalzlösung ersetzt worden war.

Tabelle 1. *Senkung des Ganguntersch iedes isolierter Einzelfasern des N. ischiadicus nach Einwirken verschiedener Novocainkonzentrationen während 30 min in % der Ausgangswerte. Jeweils Mittelwerte von 5 Fasern.*

Novocainkonzentration %	Senkung des Ganguntersch iedes
1	0
2	0
3	11%
4	17%
5	20%

Besprechung.

Die Befunde zeigen, daß Änderungen der Anisotropie der Markscheide, denen eine Störung in der Feinstruktur des Gewebes zugrunde liegen müßte, bei Novocainapplikation am intakten Nerven in situ bis zu Konzentrationen von 5% nicht auftreten. Dagegen treten solche Veränderungen an der isolierten Einzelfaser bei einer Konzentration von 3% und mehr auf. Dies zeigt, daß am ganzen Nerven die bindegewebigen Hüllen nur solche Konzentrationen bis zu den Einzelfasern vordringen lassen,

a *b*

Abb. 1. Isolierte Nervenfaser im polarisierten Licht. Polarisationsfilter ×. *a* normale Faser; *b* nach Einwirken 5%iger Novocainlösung. Am Pfeil in der Mitte der Faser kugelförmig ausgetretenes Myelin, ein sogenanntes Sphäritenkreuz darbietend.

welche keine strukturellen Störungen an der Markscheide verursachen. Bei der Anaesthesie des Nerven durch Novocain wird also die Beeinflussung der Erregbarkeit allein durch physikalisch-chemische Änderungen an Grenzschichten und eventuell an Fermentsystemen bewirkt, ohne daß es dabei zu Störungen der submikroskopischen Struktur kommt.

Die Befunde decken sich nicht mit den durch normalmikroskopische Methoden gewonnenen. Den hierbei beobachteten Veränderungen der Markscheide wie Bildung kompakter Massen, Tropfen und Granulationen (Donaggio) sowie mangelhafter Färbbarkeit und Vacuolenbildung (Glaninger u. Burian) müssen ohne Zweifel erhebliche Störungen der feinbaulichen Ordnung zugrunde liegen. Diese können jedoch unseres Erachtens nicht direkt auf die Einwirkung der untersuchten Lokalanaesthetica bezogen werden. Vielmehr verändern die in das Nervengewebe eingedrungenen Substanzen dort die Verhältnisse derart, daß die nachfolgenden Eingriffe der Fixierung und Färbung hier zu stärkeren Schädigungen führen können als an unbehandeltem Gewebe. Die im fertigen Schnittpräparat vorliegenden Veränderungen sind danach nicht als direkte Folge der Einwirkung des Lokalanaestheticums aufzufassen. Sie erlauben lediglich den Schluß, daß unter der Einwirkung des Lokalanaestheticums am Nervengewebe feinste, mit morphologischen Methoden nicht darstellbare Veränderungen vor sich gehen, die es weniger widerstandsfähig gegen die Einwirkung chemischer Substanzen bei der histologischen Technik machen. Durch deren destruierenden Einfluß wird die latente Zustandsänderung unter der Anaesthesie sichtbar gemacht.

Zusammenfassung.

Am N. ischiadicus des Meerschweinchens wurde die Doppelbrechung der Markscheide an Einzelfasern untersucht. Nach perineuraler Applikation von Novocain am ganzen Nerven in situ fand sich bei Konzentrationen von 1—5% keine Änderung der Doppelbrechung gegenüber unbehandelten Nerven.

Bei Einwirken des Novocain auf isolierte Einzelfasern traten dagegen strukturelle Veränderungen bei Konzentrationen von 3% und mehr auf. Diese bestanden in Verdickung der Faser, Absinken der Doppelbrechung und gleichmäßigem Auslöschen der Markscheide bis zu Myelinaustritten und anderen Auflösungserscheinungen. Nach den Befunden geht die Anaesthesie des peripheren Nerven mit Novocain nicht mit strukturellen Veränderungen an der Markscheide einher.

Literatur.

Boehm, G.: Das Röntgendiagramm des Nerven. Kolloid. Z. **62**, 22 (1933) zit. nach W. J. Schmidt. — Donaggio, A.: Dimostrazione dell' esistenza di una lesione organica reversibile nell' azione degli anestetici sulle fibre nervose centrali e peri-

feriche. Arch. exper. Zellforsch. **22**, 171 (1938). — Glaninger, J., und K. Burian: Histologische Studien am peripheren Nerven nach Anwendung von Lokalanaesthetica. Wien. med. Wschr. **1953**, 97. — Kato, G.: On the action of narcotics upon the nerve. Fiziol. Z. **24**, 201 (1938); ref. in Ber. ges. Physiol. **107**, 373 (1938). — Muralt A. v.: Die Signalübermittlung im Nerven. Basel 1946. — Schmidt, W. J.: Die Doppelbrechung von Caryoplasma, Cytoplasma und Metaplasma. Protoplasma-Monographien Bd. 11, Berlin 1937. — Tasaki, J.: Mikrophysiologische Untersuchung über die Grundlage der Erregungsleitung in der markhaltigen Nervenfaser. Pflügers Arch. **244**, 125 (1940). — Spiegel, E. A.: Physikalisch-chemische Untersuchungen am Nervensystem. II. Mitt. Der Einfluß der Narkotica auf die Anisotropie des Nervenmarkes. Pflügers Arch. **192**, 240 (1921).

Dr. H.-J. Kuschke, Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 224, S. 384—400 (1955).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

Zur Hemmung des Hustenreflexes durch zentral angreifende Arzneimittel.

Von
Hans Friebel, Claus Reichle und Alexander v. Graevenitz.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. November 1954.)

Die Wirkung von Arzneimitteln, die den Hustenreflex zentral dämpfen, ist im Tierversuch von Ernst, Eichler und Smiatek, Kroepfli, Bucher, Schroeder, Kase, Stefko und Benson, Domenjoz, de Vleeschhouwer, Winter und Flataker und anderen untersucht worden. Fast jeder dieser Autoren hat eine spezielle Methode angewandt, um beim Versuchstier Husten einerseits hervorzurufen und andererseits durch Arzneimittelbehandlung zu verhüten; von keinem der Untersucher wurden mehr als 4 Hustenmittel geprüft. Die Beurteilung der absoluten und relativen Wirkungsstärke von Hustenmitteln und des Verhältnisses der hustenhemmenden zur analgetischen Wirkung auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse ist infolgedessen schwierig oder gar nicht möglich.

Wir haben daher versucht, durch eine Weiterentwicklung der Arbeitsmethodik zu einem Verfahren zu kommen, mit dem die den Hustenreflex hemmende Wirkung einer größeren Zahl geeigneter Arzneimittel relativ einfach, zuverlässig und schnell bestimmt werden kann, so daß

1. quantitative Angaben über ihre gegen den Hustenreflex gerichtete Wirkung gemacht werden können;

2. das Studium der Beziehungen zwischen der hustenhemmenden, der analgetischen und noch anderen pharmakologischen Wirkungen dieser Mittel möglich wird.

Der Vergleich der den Hustenreflex hemmenden und der analgetischen Wirkungsspezifität erforderte die Untersuchung beider Wirkungen an derselben Tierart, ein vergleichbares methodisches Vorgehen und die Anwendung derselben mathematischen Auswertungsmethode. Neben den Prüfsubstanzen wurden keine anderweitigen Arzneimittel, z. B. Narkotica, Sedativa, angewandt.

I. Zur Hemmung des Hustenreflexes.

a) Methodik.

Zur Prüfung der hustenhemmenden Wirkung wurde ein Arbeitsverfahren entwickelt, das sich an die Technik von Eichler u. Smiatek anlehnt, denn die quanti-

tative Untersuchung einer größeren Zahl von Arzneimitteln bedingt die Verwendung von Kleintieren und kurzdauernde Einzelversuche. Der Husten wurde durch Einatmen eines Gemisches von SO_2 und Luft ausgelöst. Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen verwandt.

SO_2 wird einer handelsüblichen Gasflasche entnommen. Der Gasdruck in der Flasche wird zunächst grob auf 1 Atü, dann mit einem Feinventil auf etwas mehr als 20 mm Hg reduziert. Endlich wird ein Betriebsdruck von genau 20 mm Hg eingestellt, indem die vom Feinventil gelieferte 20 mm Hg überschießende Gasmenge über den offenen Schenkel eines in 10%ige Kochsalzlösung eintauchenden T-Stückes abgeleitet wird. Kontrolle des Betriebsdruckes an Hand eines Manometers, das mit 10%iger Kochsalzlösung gefüllt ist. Zugleich wird völlige Druckkonstanz erreicht. Das mit 20 mm Hg Druck vor einer Glascapillare angestaute Gas fließt durch die Capillare dem Versuchsraum zu (10,6 cm^3 SO_2/min). Bevor es aber den Versuchsraum erreicht, wird es mit 15 l/min Preßluft gemischt. Dieses SO_2-Luftgemisch erfüllt den Versuchsraum und strömt aus ihm über eine Rohrleitung ins Freie ab. Ein Dreiwegehahn, der zwischen die Capillare und den Zusammenfluß von Preßluft und SO_2 geschaltet ist, der gleichzeitig auch einen unmittelbaren Anschluß an die ins Freie führende Rohrleitung hat, gibt die Möglichkeit, das kontinuierlich der Flasche entströmende SO_2-Gas während der Pause zwischen 2 Versuchen unter Umgehung des Versuchsraumes direkt ins Freie zu leiten. Der Versuchsraum besteht aus einem Glastrog zur Aufnahme der Versuchstiere. In diesen Glastrog wird das Gas-Luftgemisch von unten her eingeleitet. Durch einen anderen Ansatzstutzen strömt es wieder nach unten ab. Ein dritter Ansatzstutzen dient zur Aufnahme und Entleerung von Harn und Kot. Über den Glastrog wird ein Glaszylinder gestülpt, der oben durch eine Cellophanmembran verschlossen ist. Auf den oberen Rand dieses Zylinders und über die Cellophanmembran wird ein mit Filz abgedichteter Deckel aus Holz gesetzt, der in einer flachen Höhlung zwei Mikrophone enthält, welche die im Zylinder entstehenden Geräusche aufnehmen. Ein Mikrophon ist über einen Verstärker mit einem Lautsprecher verbunden. Das andere Mikrophon ist an einen direktschreibenden Elektrokardiographen angeschlossen (Abb. 1).

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Meerschweinchen im Gewicht von 350—700 g verwandt. Sie wurden mit Hafer, Weizen, Heu und dem jahreszeitlich anfallenden Frischfutter gefüttert. Die Tierkäfige befanden sich zum Teil im Freien, zum Teil im heizbaren Tierhaus.

Arbeitsweise: Ein Meerschweinchen wird aufrecht in den Glastrog des Versuchsraumes gesetzt; dann wird der Glaszylinder über den Glastrog gestülpt. Anschließend wird mit dem Dreiwegehahn der SO_2-Strom — nach Durchmischung mit Preßluft — in den Versuchsraum eingeleitet. Nach 30—40 sec ist der Versuchsraum mit dem Gas-Luftgemisch gefüllt. Bei dieser Hahneinstellung werden die Tiere 2 min lang im Versuchsraum belassen und beobachtet. Zeitkontrolle mit der Stoppuhr. Husten sie während dieser Zeit, so wird die Zahl der Hustenstöße gezählt und notiert. 2 min nach Versuchsbeginn wird durch Drehen des Dreiwegehahnes der SO_2-Strom unter Umgehung des Versuchsraumes in die Außenluft abgeführt, während die weiterhin hindurchströmende Preßluft den Versuchsraum in 10 sec von Gasresten freispült. Anschließend wird der Glaszylinder abgehoben und das Meerschweinchen herausgenommen. Unmittelbar anschließend kann das nächste Tier in den Glastrog gesetzt und in derselben Weise behandelt werden. Auf diese Weise wird alle 3 min ein Testergebnis erhalten.

Bei der Arzneimittelprüfung wurden jeweils 20 mit derselben Arzneimitteldosis vorbehandelte Meerschweinchen hintereinander in den Versuchsraum gebracht. Diese 20 Tiere wurden aus einer größeren Zahl von Meerschweinchen (etwa 25)

ausgewählt. Es wurden nur solche Tiere zur Arzneimittelprüfung verwandt, die bei einer vorausgehenden im unbehandelten Zustand durchgeführten Prüfung mit Husten reagiert hatten (Zeitintervall zwischen Vor- und Hauptprüfung 1 Std). Im Laufe eines Arbeitstages können einschließlich der Auswahl reizempfindlicher Meerschweinchen an 40 Tieren Arzneimittelprüfungen durchgeführt werden. Die arzneibedingte Herabsetzung der Reizempfindlichkeit wurde genau 30 min nach der Injektion eines Medikamentes geprüft. Die hustenverhütende Wirkung einer Prüfsubstanz wurde im Einzelfall als bewiesen angesehen, wenn 30 min nach der s. c.

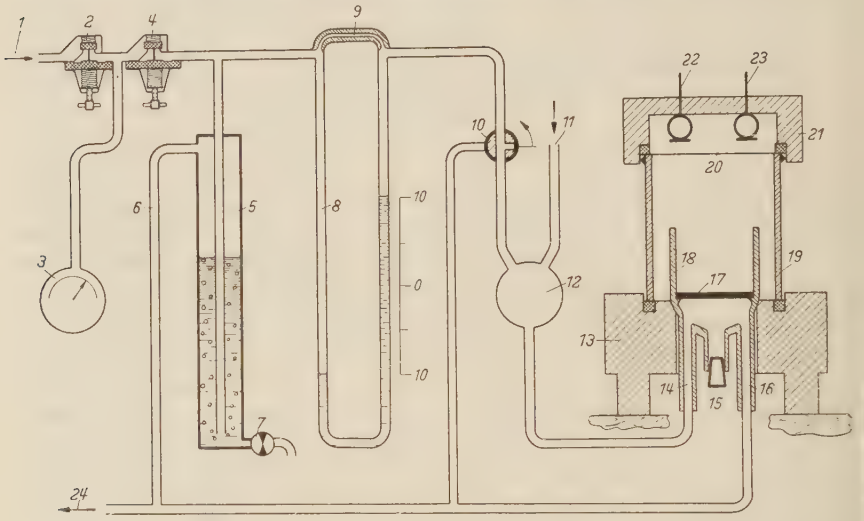


Abb. 1. Schema des Gerätes. *1* SO_2-Eingang, *2* Druckminderer, 1. Stufe, *3* Manometer, *4* Druckminderer, 2. Stufe, *5* T-förmiges Glasrohr und Überlaufgefäß zum Abführen der überschießenden Gasmenge, *6* Ableitung für überschüssiges Gas, *7* Füllstutzen, *8* Manometer, *9* Capillare, *10* Dreiwegehahn, *11* Preßluft-Eingang, *12* Mischkugel, *13* Fußteil des Versuchsraumes, *14* Ansatzstutzen für die Gasluftzuführung, *15* Ansatzstutzen für Harn- und Kotentleerung, *16* Ansatzstutzen für die Gas-Luftableitung, *17* Bodenplatte, *18* Glastrog zur Aufnahme des Versuchstieres, *19* Glaszylinder, *20* Cellophanmembran, *21* Holzdeckel, *22* u. *23* Mikrophon, *24* Abführung des SO_2-Luftgemisches ins Freie.

Arzneimittelinjektion kein einziger Hustenstoß mehr registriert wurde. Die Wirkung jeder geprüften Dosis eines Arzneimittels wurde an 20 Meerschweinchen erprobt. Die Versuchsergebnisse wurden nach der Methode von Litchfield u. Wilcoxon behandelt. Die Tiere wurden mehrmals zu den Versuchen herangezogen. Zwischen zwei Versuchen wurde eine einwöchige Ruhezeit eingeschaltet.

b) Verhalten unbehandelter Meerschweinchen im gasdurchströmten Versuchsraum.

Meerschweinchen, die in den Versuchsraum gebracht und dem SO_2-Luftgemisch ausgesetzt wurden, begannen in der Regel nach 30—40 sec etwas unruhig zu werden. Sie schnupperten, richteten sich auf und putzten an der Nase herum. 10 sec später trat dann meist der erste Hustenstoß auf, dem im Verlaufe der 2 min dauernden Exposition weitere Hustenstöße folgten.

Der einzelne Hustenstoß kann mehr oder weniger kräftig ausfallen, in jedem Falle verläuft er in typischer Weise, indem das Tier zuerst den Kopf hebt, plötzlich das Maul öffnet und einen kurzen bellenden Laut ausstößt. In den elektrokardiographisch geschriebenen Kurven derartiger Hustenstöße kehren gewisse Formgebungen immer wieder (Abb. 2). Lautstärke, Tonhöhe und Klangfarbe der Hustenstöße bedingen die Eigenart dieser Kurven. Geräusche, die nicht durch Husten bedingt sind, z. B. Kratzen an der Glaswand, verursachen Kurven, die unschwer von Hustenkurven zu unterscheiden sind.

Die Zahl der Hustenstöße, die von gleichartig gereizten Tieren in der Zeiteinheit produziert wurde, war sehr verschieden. Während einzelne

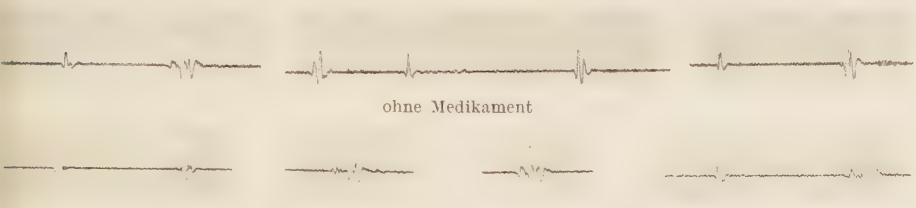


Abb. 2. Elektrokardiographische Registrierung von Hustenstößen beim Meerschweinchen. Die Formgebung der Einzelerregung hängt von der jeweils andersartigen Lautstärke, Tonhöhe und Klangfarbe des Hustenstoßes ab. Tiere, die mit Hustenmitteln behandelt wurden und dennoch husteten, lieferten die gleichen Kurvenbilder wie nicht vorbehandelte Tiere.

Tiere bis zu 20mal husteten, husteten andere überhaupt nicht. Bei aufeinanderfolgenden, wöchentlich einmal durchgeführten Versuchen, wurde beobachtet, daß die Reizbarkeit von Versuch zu Versuch schwankte (Zahl der Hustenstöße als Maßstab) (Tab. 1).

In den Spalten der Tab. 1 wird die Anzahl der Hustenstöße von 5 Meerschweinchen bei 3 in wöchentlichen Abständen durchgeführten Versuchen angegeben.

Tabelle 1. *Zahl der Hustenstöße bei aufeinanderfolgenden Versuchen.*

Tier Nr.	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
1299	2	2	5
1291	1	5	3
1217	4	15	7
1234	7	13	6
1432	5	1	2

Wenn die Tiere aus dem Versuchsraum herausgenommen worden waren, folgten in der Regel keine weiteren Hustenstöße. Nur vereinzelt wurde noch 1 bis 2mal nachgehustet. Eine ernste Schädigung der Atemwege wurde bei Tieren, die im Verlaufe eines Jahres bis zu 16mal im Versuch gewesen waren, nicht beobachtet.

Meerschweinchen, die unter der Einwirkung des SO_2-Luftgemisches husteten, husteten mit großer Regelmäßigkeit zum zweitenmal, wenn sie nach 1 Std erneut dem SO_2-Luftgemisch ausgesetzt wurden. Von 160

reizempfindlichen Tieren, die zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des Hustens 2mal innerhalb 1 Std in den Gasstrom gesetzt wurden, husteten bei der zweiten Prüfung 154 (96,2%). 40 reizempfindliche Meerschweinchen, die 6mal hintereinander mit einstündigen Intervallen dem SO_2-Luftgemisch ausgesetzt wurden, husteten ebenfalls bei jeder Exposition erneut. Auch unter diesen erschwerten Bedingungen wurden keine Symptome einer ernsten Erkrankung der Atmungsorgane beobachtet.

Die zuverlässige Reproduzierbarkeit des Hustens begründet unser Vorgehen, vor jeder Prüfung einer Arzneimitteldosis aus einem größeren Tierkollektiv eine Gruppe von ausgewählten Meerschweinchen zusammenzustellen, an der die hustenverhütende Wirkung von Arzneimitteln zuverlässig beurteilt werden kann. Die geringe Versagerquote von 3,8% $\pm$ 0,015%, die in den Gruppen ausgesuchter Tiere in Kauf genommen werden muß, wurde bei der Bewertung der Arzneimittelwirkung und der Berechnung von Testergebnissen vernachlässigt. Am Beispiel der Codeinwirkung kann gezeigt werden, daß die Reproduzierbarkeit der Prüfungsergebnisse bei diesem Vorgehen erhalten bleibt (Tab. 2).

Tabelle 2. *Reproduzierbarkeit von Prüfungsergebnissen. ED 50 = bei der Hälfte der Tiere wirksame Dosis.*

Versuch	Prozent der hustenden Tiere	Versuch	Prozent der hustenden Tiere
1	50	8	45
2	45	9	50
3	55	10	45
4	55	11	55
5	45	12	45
6	40	13	45
7	55		

Als Beispiel für die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen wird der Prozentsatz hustender Meerschweinchen angegeben, die bei mehrfachen Versuchen jeweils die ED 50 von Codein phosphor. erhalten haben. Zunächst wurde die ED 50 von Codein phosphor. (8,0; 6,1—10,4 mg/kg) an 120 Meerschweinchen ermittelt. Dementsprechend muß mit 19/20 Wahrscheinlichkeit erwartet werden, daß 41 – 60% von jeweils 20 Tieren husten, wenn ihnen bei weiteren Versuchen 8 mg/kg Codein phosphor. verabreicht werden. Bei 13 aufeinanderfolgenden Kontrollversuchen fallen mit einer Ausnahme alle Ergebnisse in diesen Bereich. Die einzige Abweichung im 6. Versuch war —, wie nachträglich erkannt wurde – , durch eine Erkrankung einiger Tiere (Senkungsabscesse) bedingt.

c) Verhalten von Meerschweinchen unter dem Einfluß von Hustenmitteln.

Meerschweinchen, bei denen die hustenhemmende Wirkung eingetreten war, verhielten sich beim Einatmen des SO_2-Luftgemisches nicht anders als in Frischluft. Nur einzelne wurden unruhig, schnupperten im Versuchsraum herum und putzten Nase und Schnauze. Bei Tieren,

die trotz der Arzneibehandlung husten mußten, fiel der einzelne Hustenstoß sowohl akustisch als auch elektrokardiographisch geschrieben (Abb. 2) nicht anders aus als bei unbehandelten Tieren. Die Zahl der Hustenstöße war aber vermindert.

Für die Bewertung der Arzneimittelwirkung konnten demnach sowohl die Verminderung der Hustenstöße, als auch das völlige Ausbleiben von Hustenstößen als Maßstab herangezogen werden. Da es manchmal schwierig ist, die Anzahl der Hustenstöße zweifelsfrei mitzuzählen und da ein lückenloses Mitschreiben mit dem EKG wegen des hohen Papierverbrauches unzweckmäßig ist, haben wir die akustische Registrierung, ob ein Meerschweinchen hustet oder nicht, der Zählung der Hustenstöße vorgezogen. Ein Vergleich der mit beiden Registriermethoden gewonnenen Ergebnisse zeigte, daß Ergebnisse, welche durch das Auszählen der Hustenstöße gewonnen wurden, eine ähnliche Streubreite haben wie Ergebnisse, bei denen die völlige Unterdrückung des Hustens die Grundlage der Berechnung bildet (Tab. 3).

Tabelle 3. *Vergleich von 2 Auswertungsmethoden.*
(Auszählen der Hustenstöße oder Zählen der hustenden bzw. nicht hustenden Tiere.)

Anzahl der Hustenstöße von je 20 unbehandelten Meerschweinchen	Anzahl der Hustenstöße von je 20 Meerschweinchen, die mit 8,0 mg/kg Codein phosphor. behandelt wurden	Verminderung der Hustenstöße in Prozent des Ausgangswertes	Prozentsatz der hustenden Tiere nach Behandlung mit 8 mg/kg Codein
68	23	34	50
50	21	42	45
77	20	26	55
59	20	26	55
60	14	23	45
65	15	23	45
104	24	23	55
58	15	26	45
140	32	23	45
69	21	30	55
53	19	36	45
73	15	27	60
65	21	32	45
	Durchschnitt:	29,1% ± 5,2%	49,6% ± 5,4%

In den Spalten 1—3 der Tabelle kennzeichnet die Verkleinerung der Zahl der Hustenstöße die Wirkung von 8 mg/kg Codein. phosphor. In der Spalte 4 wird die Arzneimittelwirkung durch die Reduktion der Zahl der hustenden Tiere charakterisiert. Bei beiden Methoden muß mit einer gleich großen Streubreite gerechnet werden. Die Registrierung hustender Tiere ist allerdings einfacher als das Mitzählen der Hustenstöße.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage der Reproduzierbarkeit von Arzneimittelwirkungen in verschiedenen Jahreszeiten gewidmet. Im

Verlaufe der Wintermonate fiel auf, daß wesentlich höhere Arzneimittelmengen zur Hemmung des Hustenreflexes benötigt wurden als in der wärmeren Jahreszeit. Die Differenz der wirkungsgleichen Arzneimitteldosen lag außerhalb der methodischen Fehlerbreite. Eine größere Arzneimitteldosis wurde nicht nur bei den im Freien vor Zug und Nässe geschützten Tieren benötigt, sondern auch bei Meerschweinchen, die im geheizten Tierhaus saßen. Während die Tiere im Winter zum Teil von Tag zu Tag eine wesentlich veränderte Reizbarkeit und Arzneimittelempfindlichkeit hatten, reagierten sie in den Sommermonaten erfreulich konstant. Die im folgenden genannten Ergebnisse von Arzneimittelprüfungen wurden daher in den Monaten Mai-September erarbeitet und eine zusätzliche Sicherung gegen zeitweilige Änderungen der Arzneimittelempfindlichkeit wurde dadurch geschaffen, daß an die Feststellung der ED 50 einer jeden geprüften Substanz die ED 50 von Codein verabfolgt und auf ihre Reproduzierbarkeit hin geprüft wurde.

II. Zur Analgesieprüfung.

Da zur Prüfung der hustenstillenden Wirkung Meerschweinchen als Versuchstiere verwandt wurden, war es notwendig, auch die Analgesieprüfung an Meerschweinchen durchzuführen. Meerschweinchen wurden zur Prüfung von schmerzstillenden Mitteln bereits von Hildebrandt sowie von Winder u. Mitarb. verwandt. Winder und Mitarb. riefen mit einem Wärmestrahl eine charakteristische Zuckung des musculus cutaneus maximus der Rückenhaut, den „twitch" hervor; sie beurteilten die analgetische Wirkung von schmerzstillenden Mitteln nach der Abschwächung bzw. Aufhebung des „twitch"-Reflexes. Ihre Arbeitsweise wurde von uns modifiziert, um zu einer möglichst weitgehenden Angleichung an den Hustentest zu kommen.

a) Methodik.

Die Versuchsapparatur besteht aus einem abblendbaren Wärmestrahler und Tierkästen. Im Wärmestrahler, der an einen Transformator (220 V/4 W) angeschlossen ist, wird die Wärme von einer Osrambirne 8100 (6 V, 5 A, vg X) erzeugt und durch den Reflektor so zentriert, daß sich der Brennpunkt etwa 11 cm unterhalb des Glühdrahtes befindet. Die Kästen zur Unterbringung der Meerschweinchen mit den Ausmaßen 45 × 18 × 7 cm enthalten je 5 Einzelboxen, die durch Einlegebrettchen verkleinert werden können. Luftlöcher an der Vorderseite jeder Boxe; abnehmbarer Kastenboden aus Zinkblech; Deckelplatte aus Plexiglas mit einer ovalen Öffnung über jeder Boxe (Abb. 3).

Als Versuchstiere wurden die gleichen Meerschweinchen verwandt, an denen die hustenhemmende Wirkung gemessen wurde. Auf Farbschattierungen wurde insofern Rücksicht genommen, als in den Gruppen, deren Angehörige gleichzeitig in den Versuch genommen wurden, Tiere aller Farbschattierungen in jeweils gleichem Prozentsatz enthalten waren. Das Fell der Meerschweinchen wurde annähernd 15 Std vor Versuchsbeginn in einem etwa 30 cm^2 großen Bezirk auf dem Rücken mit der Schere gekürzt. Die Länge der stehengebliebenen Haare betrug nicht mehr als 3 mm.

Die Meerschweinchen wurden in die Kästen gesetzt und durch Auflegen des Plexiglasdeckels so in ihrer Lage fixiert, daß das geschorene Hautareal durch die Öffnung hindurch unmittelbar vom Brennstrahl getroffen werden konnte. Dann wurde bei geschlossener Blende ein Tier mit dem geschorenen Rückenteil unter den Reflektor geschoben, anschließend die Blende geöffnet und die Zeit abgestoppt, die bis zum Eintritt des „twitch"-Reflexes verging. Bei Ausbleiben des „twitch" wurde die Bestrahlung nach 10 sec abgebrochen (Verbrennungsgefahr). Anschließend wurde mit dem nächsten Tier in gleicher Weise verfahren.

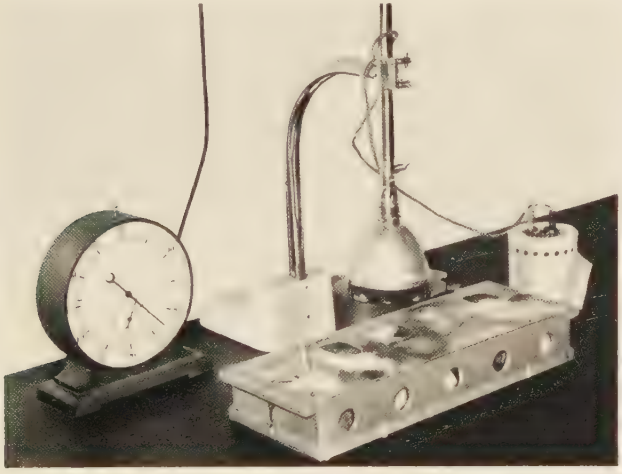


Abb. 3. Gerät zur Prüfung der analgetischen Wirkung.

Bei Arzneimittelprüfungen wurden jeweils 20 mit derselben Arzneimitteldosis vorbehandelte Meerschweinchen in 2 Gruppen zu je 10 Tieren hintereinander geprüft. Diese 20 Meerschweinchen wurden zunächst daraufhin durchgesehen, ob sie ohne Arzneimittelvorbehandlung innerhalb von 2—6 sec mit „twitch" reagierten. Wenn ein Tier — was selten vorkam — eine längere Reaktionszeit hatte, wurde es gegen ein anderes ausgetauscht. Anschließend wurden mit Intervallen von etwa 2 min von jedem Versuchstier 3 weitere Reaktionszeitwerte bestimmt. Die durchschnittliche aus den letztgenannten 3 Werten errechnete Reaktionszeit wurde als „Normalwert" bezeichnet.

Die arzneibedingte Herabsetzung der Reaktionszeit wurde daran anschließend geprüft. Analgesie wurde im Einzelfall dann angenommen, wenn 30 min nach der s. c. Arzneimittelinjektion in die Schenkelbeuge die normale Reaktionszeit (der Normalwert) um mehr als 50% verlängert war. Die Berechnung der Versuchsergebnisse, die Wiederverwendung der Tiere und die Ruhezeiten zwischen den Versuchen entsprachen unserem Vorgehen bei der Prüfung der hustenhemmenden Wirkung.

b) Die Reaktion unbehandelter Meerschweinchen auf den Wärmereiz.

Das Hautareal, welches sich zur Reizung besonders gut eignet und in dem zugleich die „twitch"-Bewegung am deutlichsten sichtbar wird, wurde im Mittelteil des Rückens ermittelt. Gegen den Nacken hin bzw. in der hinteren Rückengegend verlief die Reizantwort zögernd oder war

gar nicht mehr auslösbar. Als optimaler Wärmereiz wurde aus der Erfahrung vieler Einzelversuche die Bestrahlungsintensität ermittelt, bei der unbehandelte Tiere innerhalb von 2—6 sec mit der Muskelkontraktion reagieren. Bei geringerer Bestrahlungsintensität und längerer Bestrahlungsdauer traten grobe Streuungen des Reaktionszeitwertes auf und neben der Zuckung des Hautmuskels nahmen weitere motorische Funktionseinheiten an der Beantwortung des Wärmereizes teil. Es kam zu Veränderungen der Kopf- und Körperhaltung, gelegentlich auch zum Piepsen. Bei wiederholten Versuchen, die in größeren Zeitabständen durchgeführt wurden, ergab sich, daß gröbere Abweichungen von der erstmalig bestimmten (normalen) Reaktionszeit nicht auftraten. Auf die gleiche Reizintensität hin reagierten die einzelnen Tiere regelmäßig z. B. nach 2—3, 3—4 oder 5—6 sec. Die Länge der Reaktionszeit war beim Einzeltier im wesentlichen von der Farbe des Fells abhängig. Dunkelhaarige Tiere reagierten schneller, hellhaarige langsamer. Die Injektion von physiologischer Kochsalzlösung bedingte keine Änderung der normalen Reaktionszeiten.

c) Der Einfluß von Analgetica auf den „twitch".

Ausreichende Dosen von analgetisch wirkenden Arzneimitteln hatten eine Verlängerung der Reaktionszeiten zur Folge. Wurde die ED 50 einer Substanz subcutan verabreicht, so dauerte es in der Regel 30 min bis der Höhepunkt der analgetischen Wirkung erreicht war. Beim Dilaudid und Morphium ließ sich allerdings an Hand der Dosis-Wirkungskurven nachweisen, daß der Höhepunkt der analgetischen Wirkung erst nach 50—60 min erreicht wird. Da bei den hier beschriebenen Versuchen nicht die absolute analgetische Wirkungsstärke, sondern das Verhältnis von analgetischer zu hustenhemmender Wirkung bestimmt werden sollte, konnte darauf verzichtet werden, bei diesen Substanzen von dem üblichen Vorgehen, 30 min nach der Injektion die analgetische bzw. hustenhemmende Wirkung zu prüfen, abzuweichen. Schmerzstillende Arzneimittel, die von der Anwendung beim Menschen her als schwache Analgetica bekannt sind (Codein, Paracodin, Dionin) konnten selbst bei hoher Dosierung nicht bei allen Tieren einer Gruppe den „twitch"-Reflex verhindern. Es war zwar möglich, die ED 50 dieser Substanzen korrekt zu ermitteln, es gelang aber nicht — wie es z. B. mit Morphium, Dilaudid oder Dromoran immer möglich war — eine 100%ige Analgesie zu erreichen. (Wir hatten daher bereits bei der Analgesieprüfung Zweifel, ob Codein, Paracodin und Dionin als typische Analgetika angesehen werden können.) Einige der geprüften Substanzen verursachten Vergiftungssymptome, noch ehe eine 100%ige Analgesie erreicht wurde (Polamidon, Dionin, Pyramidon). Die früh auftretenden Vergiftungserscheinungen können wohl im wesentlichen auf eine Einengung der therapeutischen

Breite dieser Substanzen zurückgeführt werden, die eine Folge der beim „twitch" erforderlichen hohen Dosierung ist. Dennoch konnte die ED 50 auch bei diesen Substanzen bestimmt werden (mit Ausnahme von Pyramidon). Einer Gewöhnung an Analgetica wurde vorgebeugt, indem die Tiere in 7-Tage-Intervallen zur Analgesieprüfung herangezogen wurden. Die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse wurde im Stichverfahren immer wieder überprüft und bestätigt.

III. Zur hustenhemmenden und analgetischen Wirkungsspezifität.

Die Untersuchung der hustenhemmenden und analgetischen Wirkung wurde im Verlaufe eines Jahres an 450 Meerschweinchen durchgeführt. Aus 16000 Einzelmessungen, die v. Graevenitz im Rahmen einer erweiterten Analgesieprüfung durchgeführt hat, wurden die in diesem Zusammenhang erforderlichen Meßwerte ausgewählt. Zur Bestimmung der hustenhemmenden Wirkung wurden 7000 Einzelversuche durchgeführt. Diese Prüfungen gaben die Grundlage für das Studium der Beziehungen zwischen beiden Wirkungsqualitäten. Die geprüften Arzneimittel sind, soweit es sich nicht um Morphin und seine Abwandlungsprodukte handelt, in der Tab. 4 zusammengefaßt.

Die Wirkungsgeraden für die hustenhemmende und die analgetische Wirkung dieser Stoffe sind in den Abb. 4a und b untereinander gestellt.

Aus dem Vergleich der Abb. 4a und 4b geht hervor, daß

1. zur Hemmung des Hustens von jeder Substanz eine geringere Arzneimitteldosis erforderlich ist als zur Hemmung des „twitch",

2. die Gruppierung der einzelnen Arzneimittel in jedem Bild andersartig ist. Codein, Paracodin und Dionin, die im Rahmen der Analgesieprüfung als schwache Analgetica von den übrigen abgesetzt erscheinen, stehen bei Berücksichtigung ihrer Hustenwirkung nicht gesondert. Auch der Neigungswinkel der Wirkungsgeraden ist in beiden Abbildungen verschieden. Der Anstieg verläuft bei den Wirkungsgeraden für die hustenhemmende Wirkung weniger steil. So zeigten diese Darstellungen bereits, daß die Prüfsubstanzen neben der analgetischen Wirkung nicht immer eine anteilmäßig gleich starke hustenhemmende Wirkung haben. Eine klare Beweisführung für diesen Schluß ist auf der Grundlage des Neigungswinkels der Wirkungsgeraden nicht möglich, da die Differenz der Neigungswinkel S zu gering ist. Der Quotient aus der analgetischen ED 50 und der hustenhemmenden ED 50 gibt eine bessere Vergleichsmöglichkeit (Tab. 5).

In der Tabelle sind die effektiven Dosen für beide Wirkungsqualitäten mit ihren Grenzen, die Neigungswinkel der Wirkungsgeraden mit ihren Grenzen sowie der Quotient von analgetischer zu hustenstillender ED 50 zusammengefaßt. Die Reihenfolge der Substanzen wurde nach der Größe

Tabelle 4.

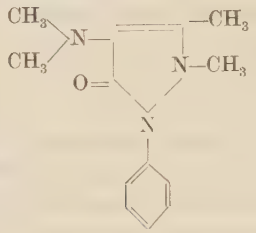
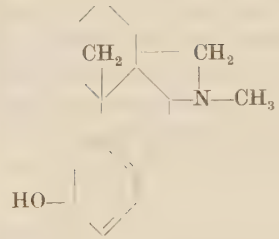
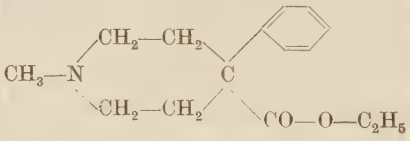
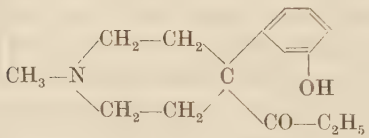
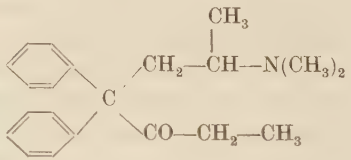
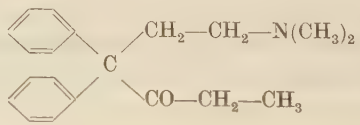
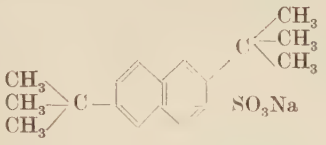
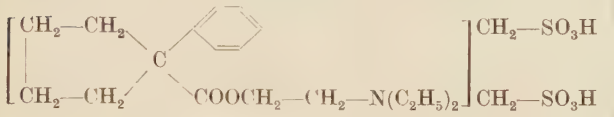
Nr.		chemische Bezeichnung	Handelsbezeichnung
1		Dimethylamino-phenyl-dimethyl-Pyrazolon	Pyramidon
2		3-Oxy-N-Methyl-Morphinan tartar	Dromoran
3		N-methyl-4-phenyl-piperidin-4-Carbonsäure-äthylester hydrochlor	Dolantin
4		1-methyl-4-(m-oxyphenyl-piperidin-4-Äthylketon hydrochlor	Cliradon
5		2-dimethylamino-3,3′-diphenyl-Heptanon(5) hydrochlor	Polamidon
6		1-dimethylamino-3,3′-diphenyl-Hexanon(4) hydrochlor.	Hoechst 10582 (Tikarda-Wirkstoff)

Tabelle 4. (Fortsetzung.)

Nr.		chemische Bezeichnung	Handelsbezeichnung
7		2,6-Di-ter-butylnaphthalin-sulfonat-Na	Linctussal-Wirkstoff
8		Bis-[1-(carbodiäthyl-aminoäthoxy)-1-phenyl-cyclopentan]-äthan disulfat	Taoryl

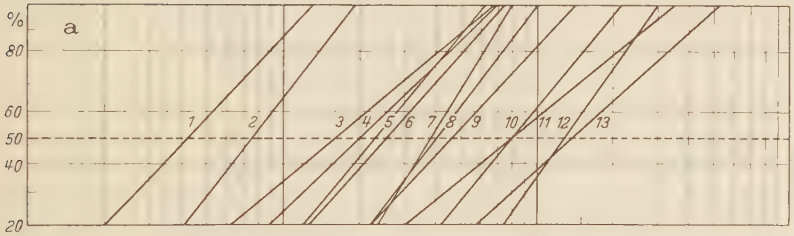


Abb. 4a. Wirkungsgeraden für die hustenhemmende Wirkungsspezifität.

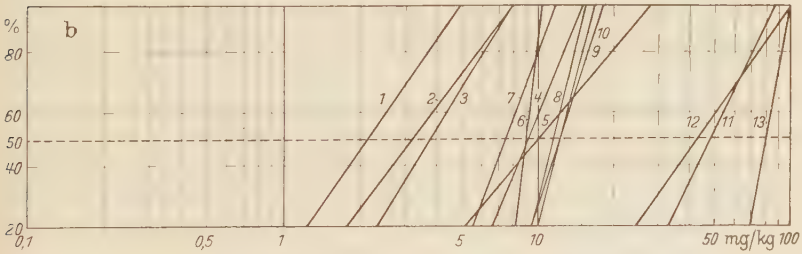


Abb. 4b. Wirkungsgeraden für die analgetische Wirkungsspezifität.

Abb. 4. Wirkungsgeraden für die hustenhemmende und analgetische Wirkungsspezifität der untersuchten Substanzen.

Zu Abb. 4a und 4b: Auf den Ordinaten der beiden Abbildungen ist der Prozentsatz der nach Arzneimittelbehandlung nicht hustenden bzw. analgetischen Tiere aufgetragen, die Abszisse gibt die Menge der verabreichten Arzneimittel in mg/kg an. Arzneimittel: *1* Eukodal, *2* Dilaudid, *3* Polamidon, *4* Dicodid, *5* Cliradon, *6* Acedicon, *7* Dromoran, *8* Morphin, *9* Hoechst10 582 (Tikarda-Wirkstoff), *10* Dolantin, *11* Codein, *12* Dionin, *13* Paracodin.

Tabelle 5. *Wirkungsquotient, analgetische und hustenhemmende ED 50 und Neigungswinkel S der untersuchten Substanzen.*

Präparat	$\frac{\text{analgetische}}{\text{hustenhemmend.}}$ ED 50	analget. ED 50 mg/kg	Neigungswinkel S	hustenhemmend. ED 50 mg/kg	Neigungswinkel S
Dolantin . . .	1,53 (1,13—2,06)	12,30 (11,61—13,05)	1,28 (1,14—1,43)	8,0 (5,97—10,72)	2,14 (0,97— 4,7)
Dromoran . .	1,91 (1,49—3,43)	7,3 (6,4 — 8,32)	1,44 (1,32—1,57)	3,8 (3,09— 4,67)	1,76 (1,1 — 2,64)
Polamidon . .	2,31 (1,5 —3,55)	3,7 (3,01— 4,55)	1,77 (1,39—2,27)	1,6 (1,1 — 2,32)	3,03 (1,83— 4,99)
Höchst 10582 .	2,66 (1,9 —3,72)	12,25 (11,0 —12,9)	1,35 (1,14—1,61)	4,6 (3,28— 6,44)	2,4 (1,45— 3,86)
Morphin . . .	2,87 (2,29—3,59)	11,5 (10,55—12,54)	1,25 (1,13—1,4)	4,0 (3,25— 4,92)	2,07 (1,53— 2,79)
Dionin	3,3 (2,53—4,29)	43,0 (34,96—52,90)	1,95 (1,76—2,17)	13,0 (10,8 —15,6)	1,88 (1,04— 3,38)
Acedicon . . .	3,6 (2,66—4,86)	9,0 (8,57— 9,45)	1,12 (0,97—1,29)	2,5 (1,86— 3,35)	2,29 (1,3 — 4,0)
Dilaudid . . .	4,13 (2,8 —5,9)	3,1 (2,42— 3,96)	2,03 (1,29—3,21)	0,75 (0,58— 0,96)	2,0 (1,33— 3,0)
Diradon . . .	4,34 (2,8 —6,72)	10,0 (8,33—12,0)	2,2 (1,55—3,15)	2,3 (1,48— 3,56)	2,16 (1,2 — 3,88)
Dicodid . . .	4,6 (3,23—6,53)	9,2 (8,29—10,21)	1,47 (1,18—1,85)	2,0 (1,42— 2,8)	2,6 (0,93— 7,28)
Eukodal . . .	4,88 (3,18—7,46)	2,1 (1,55— 2,83)	1,91 (1,21—3,02)	0,43 (0,31— 0,58)	2,42 (1,1 — 3,32)
Paracodin . .	5,71 (3,93—8,27)	80,0 (76,33—83,85)	1,17 (1,13—1,22)	14,0 (9,65—20,3)	2,87 (0,63—12,91)
Codein	6,62 (4,97—8,80)	48,5 (43,3 —54,32)	1,58 (1,44—1,75)	8,0 (6,1 —10,4)	3,07 (2,1 — 4,29)

Taoryl
Linctussal — Keine strenge Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis

Beschreibung im Text.

des Quotienten geordnet. Unter Berücksichtigung der Grenzen des Quotienten können 4 Gruppen unterschieden werden. Die 1. Gruppe (Dolantin bis Morphium) hat den kleinsten Quotienten. Sie kann von der 3. Gruppe (Paracodin bis Codein), die den größten Quotienten hat, sicher abgegrenzt werden. Die mittlere Gruppe (Dionin bis Eukodal) nimmt eine Zwischenstellung ein. Von den Substanzen der 4. Gruppe (Taoryl, Linctussal) konnte kein Quotient ermittelt werden, da bei beiden Substanzen eine mathematisch korrekte Beziehung zwischen der verabfolgten Dosis und der hustenhemmenden Wirkung nicht festgestellt werden konnte. Bei den Substanzen der Gruppe 1 ist die analgetische Wirkung relativ stark ausgeprägt, bei den Substanzen der Gruppe 3 steht die hustenstillende Wirkung im Vordergrund.

Aus der Ungleichheit der in der ersten Spalte zusammengefaßten Quotienten geht demnach mit Sicherheit hervor, daß einige Substanzen vergleichsweise stärker hustenhemmend wirken, während bei anderen die analgetische Komponente stärker hervortritt. Eine ungefähre Parallelität von analgetischer und hustenhemmender Wirkung besteht nicht.

Die 4 Substanzen, bei denen die Wirkung auf den Hustenreflex am stärksten im Vordergrund steht (Codein, Paracodin, Eukodal, Dicodid) und außerdem das Acedicon tragen als Substituenten in 3-Stellung des Phenanthrenringes eine Oxymethylgruppe.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

a) Zur Problemstellung.

Die Frage, ob eine Parallelität zwischen der hustenhemmenden und schmerzhemmenden Wirkung von Arzneimitteln besteht, ist sowohl im wissenschaftlich-theoretischen Sinne als auch für die Therapie interessant. Bisher wurde die Ansicht von Schaumann — die Dämpfung auf den Hustenreiz gehe mit der analgetischen Wirkung ungefähr parallel — allgemein für gültig gehalten. Untersuchungen, die Winter und Flataker kürzlich veröffentlicht haben, lassen aber Zweifel an der Richtigkeit der bisherigen Vorstellung aufkommen. Winter und Flataker fanden, daß die rechtsdrehende Form von Methadone (Polamidon) und Iso-Methadone (4,4-Diphenyl-5-methyl-6-dimethylaminohexanon-3) im Vergleich zur linksdrehenden nur geringe analgetische, zugleich aber starke hustenhemmende Eigenschaften hat. Über die quantitativen Wirkungsverhältnisse kann man aus ihren Versuchen nur wenig entnehmen, da die analgetische und die hustenhemmende Wirkung an 2 verschiedenen Tierarten (Hund und Ratte) geprüft wurden.

b) Hustentestverfahren.

Unser Hustentestverfahren bietet gegenüber anderen vergleichbaren Methoden den Vorteil des geringeren apparativen Aufwandes, der

bequemeren Handhabung, der mathematischen Auswertbarkeit und der schnellen Arbeitsweise.

Wenn der Reiz, den SO_2 (bzw. H_2SO_3) auf die Tracheal- und Bronchialschleimhaut des Versuchstieres ausübt, dem Reiz durch Schwefelsäuredampf oder -aerosol weitgehend entsprechen sollte, besteht der Unterschied der eigenen Methodik gegenüber dem Vorgehen von Eichler u. Smiatek, Winter u. Flataker sowie de Vleeschhouwer, die Schwefelsäure verwandten, weniger in der Art des Reizmittels als vielmehr in seiner Anwendungsweise. Die Verwendung von Meerschweinchen als Versuchstierart wurde eingangs begründet. Auf die Brauchbarkeit des mathematischen Auswertungsverfahrens von Litchfield u. Wilcoxon haben im deutschen Schrifttum Soehring, Kraushaar und andere hingewiesen.

c. Angriffspunkt der Hustenmittel.

Das Verhalten der mit Hustenmitteln behandelten Meerschweinchen läßt einige Schlüsse auf den hustenhemmenden Angriffspunkt der Arzneimittel zu. Der Ablauf und die Stärke der einzelnen Hustenstöße, welche von Meerschweinchen produziert werden, die unter Arzneimitteleinwirkung stehen, unterscheidet sich in keiner Weise von den Hustenstößen unbehandelter Meerschweinchen. Wir glauben daher, daß der effektorische Schenkel der Hustenreflexbahn durch die Arzneimittelwirkung nicht beeinflußt wird. Ob auch die afferente Leitungsbahn von der Arzneimittelwirkung nicht betroffen wird, muß in weiteren Versuchen geklärt werden. Die afferente Leitungsbahn des Schmerzreflexes wird nach Ansicht von Schaumann z. B. von der Morphinwirkung nicht betroffen. Trifft diese seine Annahme auch für die Hustenwirkung zu, so wird man als hauptsächlichen Angriffspunkt für die als Hustenmittel wirkenden Stoffe die Umschaltstelle im Reflexbogen ansehen dürfen.

d. Reproduzierbarkeit von Testergebnissen.

Die wechselnde Arzneimittelempfindlichkeit der Meerschweinchen in der kalten Jahreszeit dürfte auf die bekannte Witterungsempfindlichkeit dieser Tierart zurückzuführen sein, denn die Meerschweinchen benötigen in dieser Jahreszeit zeitweilig nicht nur erhöhte Dosen von Arzneimitteln, sie konnten auch durch geringere SO_2-Gasmengen zum Husten gebracht werden. Nicht nur der Außentemperatur weitgehend ausgesetzte Tiere hatten eine wechselnde Reaktivität, auch Meerschweinchen, die im geheizten Tierhaus saßen, reagierten im Winter nicht völlig gleichmäßig.

e. Zur Analgesieprüfung.

Das methodische Vorgehen bei der Analgesieprüfung wurde auf das Hustentestverfahren abgestimmt. Die Brauchbarkeit unseres Arbeitsverfahrens, das eine Modifikation des „twitch"-Testes von Lewis u. Ercoli darstellt, ist von v. Graevenitz ausführlich begründet worden. Der Angriffspunkt für die analgetische Spezifität der verwandten Arzneimittel ist von Schaumann ausführlich diskutiert worden.

f. Vergleich der hustenhemmenden mit der analgetischen Wirkung.

Die Vergleichbarkeit beruht auf der Ermittlung der effektiven Dosen für beide Wirkungsqualitäten an der gleichen Tierart unter Verwendung derselben Auswertungsmethode. Die auf der Basis der ED 50 rechnerisch bewiesene Differenz von Stoffen mit betont analgetischer Spezifität einerseits und betont hustenhemmender Spezifität andererseits ist auch auf andere Weise nachweisbar. Man kann bei der Berechnung z. B. dem Vorgehen von Fleisch und Dolivo folgen und ihr Verfahren zur Korrelationsbestimmung des antipyretischen und analgetischen Effektes sinngemäß anwenden. Mit diesem Auswertungsverfahren kommt man zum gleichen Ergebnis. Die verschiedene Ausprägung der relativen Stärke der hustenhemmenden und analgetischen Wirkung bestätigt die therapeutische Erfahrung, nach der z. B. Morphin eine hohe analgetische und Codein eine hohe hustenhemmende Wirkung hat. Gleiches gilt für das Polamidon und Dolantin einerseits und Paracodin andererseits.

Man wird jedoch diese am Meerschweinchen erhaltenen Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf andere Tierarten oder den Menschen übertragen dürfen. Bei der Feststellung der analgetischen Wirkungspotenzen wurde z. B. für Eukodal eine unerwartet starke Wirkung ermittelt. Die analgetische ED 50 von Eukodal war mit 2,1 mg/kg wesentlich kleiner als die analgetische ED 50 vom Morphin mit 11,5 mg/kg. Von der Anwendung beim Menschen ist aber bekannt, daß Morphin und Eukodal in recht ähnlicher Dosierung verabreicht werden. Auch das Verhältnis der Dolantin- zur Morphinwirkung ist nach den Ergebnissen am „twitch" ein anderes als beim Menschen. Man darf vermuten, daß die Art der Untersuchungsmethode und die Auswahl der Versuchstiere das Ergebnis der vergleichenden Prüfung von Arzneimitteln wesentlich beeinflußt.

Bei der quantitativen Bestimmung der beiden Wirkungsqualitäten wurde in der Regel eine strenge Abhängigkeit der Wirkung von der verabfolgten Dosis gefunden. Eine Ausnahme davon sahen wir nur bei zwei der als Hustenmittel verwandten Substanzen, beim Taoryl und Linctussal-Wirkstoff. Beide Stoffe verhinderten bestenfalls bei 30% der Tiere den Hustenreflex. Arzneimitteldosen, die erwartungsgemäß bei einem höheren Prozentsatz von Tieren den Husten hemmen mußten, unterdrückten nur bei einem kleineren Anteil, z. B. bei 20—25% der Tiere, den Hustenreflex. Diese Ergebnisse stimmen zwar mit den Angaben von Domenjoz (Taoryl) und de Vleeschhouwer (Linctussal) nicht vollkommen überein; die beiden Autoren ermittelten aber die Wirkung dieser Stoffe nicht quantitativ, sie gaben ferner ihren Versuchstieren (Hunden und Katzen) zusammen mit dem Hustenmittel Narkotica bzw. Sedativa, so daß eine Parallelität der Ergebnisse nicht erwartet werden darf.

Zusammenfassung.

Die absolute und relative hustenhemmende und analgetische Wirkungsstärke von 16 Arzneimitteln wurde am Meerschweinchen bestimmt. Zur Ermittlung der hustenhemmenden Wirkung wurde ein Testverfahren entwickelt, bei dem der Hustenreiz mit Hilfe von einem SO_2-Luftgemisch erzeugt wird. Zur Prüfung der analgetischen Wirkung diente eine Modifikation des „twitch"-Testes. Die Berechnung der effektiven Dosen für

jede Wirkungsqualität (ED 50 mit Grenzen) erfolgte nach dem Verfahren von Litchfield und Wilcoxon. Aus dem Vergleich der hustenhemmenden und analgetischen Wirkung geht hervor, daß beim Meerschweinchen die beiden Wirkungen nicht parallel gehen, daß unter den sogenannten „Analgetica" einige Stoffe eine hervorragende hustenhemmende Wirkung (Codein, Paracodin), andere eine vorwiegend analgetische Wirkung (Dolantin, Dromoran, Polamidon, Hoechst 10582, Morphin) haben. Dionin, Acedicon, Dilaudid, Cliradon, Dicodid, Eukodal nehmen eine Zwischenstellung ein. Ob gleiche oder ähnliche Beziehungen auch bei anderen Tierarten und beim Menschen bestehen, bleibt eine noch offene Frage.

Fräulein Marita Dreesbach danken wir für ihre wertvolle Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Untersuchungen.

Literatur.

Bucher, K.: Helvet. physiol. Acta 8, 33 (1950). — Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 19 (1952). — Eichler, O., u. A. Smiatek: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **194**, 621 (1940). — Ercoli, N., and M. N. Lewis: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **84**, 301 (1945). — Ernst, A. M.: Arch. internat. Pharmacodynamie **68**, 363 (1938). — Fleisch, A., and M. Dolivo: Helvet. physiol. Acta **11**, 305 (1953). — Graevenitz, A. v.: unveröffentl. Versuche (1954). — Hildebrandt, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **174**, 405 (1934). — Kase, Y.: Jap. J. Pharmacol. **2**, 7 (1952). — Kraushaar, A.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 247 (1953). — Kroepfli, P.: Helvet. physiol. Acta **8**, 33 (1950). — Litchfield, J. T. jr., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Schaumann, O.: Wien. klin. Wschr. **1953**, 133. — Schroeder, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 433 (1951). — Soehring, K.: Ärztl. Forsch. **7**, 85 (1953). — Stefko, P. L., and W. M. Benson: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 217 (1953). — Vleeschhouwer, G. de: Arch. internat. Pharmacodynamie **47**, 34 (1954). — Winder, C. V., et Mitarb.: Arch. internat. Pharmacodynamie **72**, 329 (1946). — Winter, C., and L. Flataker: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 463 (1952).

Doz. Dr. Hans Friebel, Bonn, Reuterstr. 2b, Pharmakolog. Institut.

Berichtigung

zur Arbeit Zorn und Mankel, Band 223, Seite 362—368 (1954).

In der Abbildungsunterschrift auf Seite 364 muß es in der drittletzten Zeile „abgeschwollen" statt „angeschwollen" heißen.

Aufnahmebedingungen.

I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Der Inhalt der Arbeit darf nicht — sei es auch nur zum Teil oder in anderer sprachlicher Fassung — bereits bei anderen Zeitschrift zur Veröffentlichung gelangt oder eingereicht sein.
3. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Be- e können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beob- ıngen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vor- ge Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tat- ınde ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die :hung anregen.

II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern liefern. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und rgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und sprachlich gut geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu leiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des nas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) ıstellen.
3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Dar- ıng der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.
4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, hin- n können besondere Inhaltsverzeichnisse für einzelne Arbeiten nicht abgedruckt werden.
5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll (Krankengeschichten, ionsbericht, Versuch) im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche llarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. (Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hin- eisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.)
6. Die *Abbildungen* sind auf das wirklich *unbedingt Notwendige* zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur llustration von Befunden dienen, die ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. nders gilt dies von Rußkurven, die nur angebracht werden, wenn damit ganz außergewöhnliche, neue Befunde be- werden. Kurze, aber erschöpfende Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Für jede uchsart, jede Krankenbeschreibung, jedes Präparat ist nur ein gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ie doppelte Darstellung in Tabelle und Kurve. Didaktische Gesichtspunkte bleiben bei der Entscheidung über die ahme einer Abbildung außer Betracht, da das Archiv nicht von Anfängern gelesen wird.
a) Für Halbtonbilder (Photos, Rußkurven) sind reproduktionsfähige, d. h. scharfe, gut durchgezeichnete Vorlagen hglanzabzüge!) einzureichen.
b) Für Kurven und Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden sollen, sind saubere, klare, tiefschwarzer Tusche auf weißes Zeichen- oder Transparentpapier gezeichnete Vorlagen abzuliefern, die nicht mehr ezeichnet zu werden brauchen. Ist eine Beschriftung vorgesehen, so ist sie ebenfalls reproduktionsfähig in klarer, erer Blockschrift einzutragen. Ist der Autor dazu nicht in der Lage, wird um Angabe des Beschriftungstextes in tift gebeten. Bei der Beschriftung durch den Autor ist zu beachten, daß die Höhe der Großbuchstaben und Zahlen r reproduzierten Abbildung 2 mm betragen soll. Ist also eine lineare Verkleinerung der Strichzeichnung auf ½ vor- ıen, so müßten die Buchstaben 4 mm groß gezeichnet werden.
7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel Arbeit, Zeitschriftentitel in der Abkürzung nach den Periodica medica, Band-, Seiten- und Jahreszahl (Wochen- ften nur Jahres- und Seitenzahl). Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alpha- ch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der be- enden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literatur- eichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem , Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.
8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzu- ten. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.
9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen, um den Anschein größerer Kürze zu erwecken, ist unzulässig.
0. Bei Anführungen von Handelspräparaten soll stets neben der Markenbezeichnung die chemische Zusammensetzung geben werden.
1. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- Untertitel nicht die gleichen sind.
2. Festschriften, Habilitationsschriften und Monographien gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Laboratoriumsdiagnose menschlicher Virus- und Rickettsieninfektionen.

Ein Leitfaden. Von Dr. med. **Wilhelm Klöne**, Laboratorium der Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf. Mit 10 Abbildungen. VII, 161 Seiten Gr.-8. 1953. Steif geheftet DM 16,80

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Physiologische Chemie

Ein Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker

Hervorgegangen aus dem Lehrbuch der Physiologischen Chemie von **Olof Hammarsten.** In zwei Bänden.

Soeben erschien:

Zweiter Band: **Der Stoffwechsel**

Herausgegeben von Professor Dr. **B. Flaschenträger,** Alexandria, und Professor Dr **E. Lehnartz,** Münster i. W.

Erster Teil: Bearbeitet von H. W. Berendt, F. L. Breusch, K. Felix, B Flaschenträger, K. Hinsberg, F. Holtz, E. Jorpes, F. W. Krzywanek †, K. Lang, F. Leuthardt, G. Martius, H. Netter, E. Schütte, G. Siebert W. Siedel, Z. Stary, Hj. Staudinger, G. Stoeck, E. Strack, O. Wiss, K. Zipf

Mit 62 Textabbildungen. VI, VI, 1717 Seiten Gr.-8°. 1954. In zwei Bänden gebunden Ganzleinen DM 198.—

Inhaltsübersicht: Bandteil a. **D. Physiologische Chemie der Lebensvorgänge und Organe.** I. Auf bereitung und Transport. 1. Die Biochemie der Verdauung. Von F. W. Krzywanek † und B. Flaschen träger, Alexandria. 2. Die Biochemie der Resorption (Aufsaugung). Von E. Strack, Leipzig. 3. Das Blut a) Das Blut als Ganzes. Von K. Hinsberg, Düsseldorf. b) Das Blutplasma und Blutserum. Von K. Hinsberg Düsseldorf. c) Die geformten Bestandteile des Blutes. Von K. Hinsberg, Düsseldorf, bearbeitet von H. W Berendt, Mölln/Lauenburg. d) Die Blutgerinnung. Von E. Jorpes, Stockholm. e) Die Atmungsfunktio des Blutes. Von K. Felix, Frankfurt a. M. f) Das Säure-Basengleichgewicht im Blut. Von K. Felix Frankfurt a. M. 4. Lymphe und verwandte Flüssigkeiten. Von K. Hinsberg, Düsseldorf. — II. Stoff wechsel ohne wesentliche Wärmetönung. 1. Wasserstoffwechsel. Von E. Schütte, Berlin. 2. Mineral stoffwechsel. Von E. Schütte, Berlin. 3. Knochengewebe und Verkalkung. Von F. Holtz, Halle a. S und E. Schütte, Berlin. — III. Intermediärer Stoffwechsel. 1. Stoffwechsel der Kohlenhydrate Von F. L. Breusch, Istanbul. 2. Stoffwechsel der Fette. Von K. Lang, Mainz. — Bandteil b. 3. Stoffwechsel de Phosphatide. Von Z. Stary, Istanbul. 4. Stoffwechsel des Cholesterins und der Steroidhormone. Von H. Staudinger und G. Stoeck, Mannheim. 5. Stoffwechsel der Eiweißstoffe und Aminosäuren. Von O. Wiss Tübingen. 6. Der Stoffwechsel der Porphyrine. Von W. Siedel, Frankfurt a. M. 7. Der oxydative Endabbau Von C. Martius, Würzburg. 8. Die chemischen Leistungen der morphologischen Zellelemente. Von K. Lan und G. Siebert, Mainz. 9. Die Reaktion der Zellen und Gewebe. Von H. Netter, Kiel, und F. Leuthardt Zürich. 10. Der Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine. Von K. Zipf, München. — **Namen- und Sach verzeichnis.**

Zweiter Band, zweiter Teil in Vorbereitung.

Früher erschien:

Erster Band: **Die Stoffe**

Herausgegeben von **B. Flaschenträger,** Alexandria, unter Mitwirkung von **E. Lehnartz,** Münster i. Westf.

Bearbeitet von D. Ackermann, G. Blix, H. Bredereck, P. Brigl †, A. Butenandt, K. Felix, B. Flaschenträger, F. Flury †, K. Freudenberg, K. Gemeinhardt, W. Grassmann, Chr. Grundmann, F. Holtz, E. Klenk, H. Knoop †, H. Kraut, W. Kuhn, H. Müller, Th. Ploetz, F. Schneider G. Schramm, W. Siedel, T. Thunberg, J. Trupke, R. Weidenhagen Ä. Weischer, K. Zeile.

Mit 93 Textabbildungen. VIII, 1600 Seiten Gr.-8°. 1951. Ganzleinen DM 198.—

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBER

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei.

Verantwortlich für den Anzeigenteil: Günter Holtz, Berlin W 35, Reichpietschufer 20. — Springer-Verl Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH — Printed in Germa